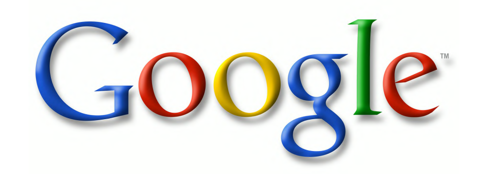
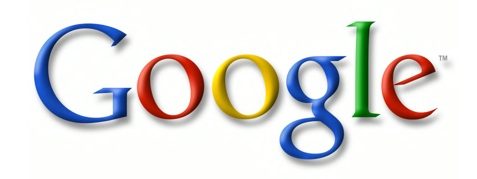




M. FUNCK

MANUEL
DE
BACTÉRIOLOGIE CLINIQUE

H. Lamertin, Éd. Bruxelles





ERNST IST DAS LEBEN





MANUEL

DE

BACTÉRIOLOGIE CLINIQUE

DU MÊME AUTEUR :

Manuel de Sérothérapie antidiphtérique, avec une préface de M. le professeur DESTRÉE. Un vol. 161 p. Lamertin, éditeur . . . . fr. 3 00

La Sérothérapie de la fièvre typhoïde. Thèse présentée à la Faculté de médecine. Un vol. 94 p., 1896. . fr. 3 00

MANUEL

DE

BACTÉRIOLOGIE CLINIQUE

PAR

M. FUNCK

CHEF DU LABORATOIRE DE BACTÉRIOLOGIE DE L'UNIVERSITÉ
DE BRUXELLES,
DIRECTEUR DE L'INSTITUT SÉROTHÉRAPIQUE

Avec sept planches coloriées hors texte.

BRUXELLES
HENRI LAMERTIN, Éditeur
20, RUE DU MARCHÉ-AU-BOIS, 20

1901


LIBRARY OF THE
HARVARD MEDICAL SCHOOL
Gift of
Mrs. Ernst
April
1923

AVANT-PROPOS

Ce manuel est un résumé du cours pratique de bactériologie que nous donnons depuis trois ans à l'Université de Bruxelles. Il s'adresse par conséquent aux étudiants qui désirent revoir rapidement ce qu'ils ont appris dans les manipulations du laboratoire et aux médecins qui peuvent y puiser les renseignements indispensables pour pratiquer une analyse bactériologique. On n'a pas toujours la possibilité de recourir aux lumières d'un spécialiste, comme il est si facile de le faire dans les grands centres scientifiques. Or, un médecin doit pouvoir faire des examens microscopiques de

crachats, de pus, d'exsudats quelconques ; nous avons voulu démontrer que ces recherches ne sont pas difficiles et qu'elles ne nécessitent pas d'installations coûteuses ; il faut savoir qu'elles ne demandent pas beaucoup de temps et se rappeler même qu'elles sont souvent largement rémunérées.

Nous avons cherché à être clair et concis : laissant de côté tout ce qui ne se rapporte pas à la pratique courante, nous avons tenu à ne mentionner dans ce manuel que les microbes pathogènes qu'un médecin peut être amené à rencontrer tous les jours dans sa clientèle.

Nous avons envisagé d'abord la technique microscopique, c'est-à-dire la façon de faire une préparation pour l'examen direct ; ensuite nous avons étudié la technique bactériologique proprement dite et les méthodes employées pour obtenir une culture pure.

Ces deux chapitres doivent servir d'introduction à l'étude des microbes et nous amènent à l'examen systématique des bactéries pathogènes pour l'homme, dont nous ne passons en revue que les espèces principales en signalant

leurs caractères microscopiques, biologiques et pathogènes les plus importants.

Enfin, nous avons terminé cet exposé par un résumé succinct de l'état actuel de la question de l'immunité, en réservant un chapitre spécial aux résultats pratiques des vaccinations et de la sérothérapie qui intéressent le praticien au double point de vue de la prophylaxie et du traitement des maladies infectieuses.

Tel qu'il se présente, nous pensons que ce manuel pourra rendre quelques services à la condition qu'on s'en serve non pas comme un moyen d'apprendre ce qu'on ne sait pas, mais comme un moyen de récapituler ce qu'on a déjà appris.

Pour faciliter ce travail, nous avons cru utile d'ajouter quelques planches dessinées d'après nature et qui permettront au débutant de s'y retrouver plus facilement dans la différenciation des microbes pathogènes les plus répandus.

M. FUNCK

Bruxelles, juin 1900.

CHAPITRE PREMIER

La Technique microscopique.

I. — *Le Microscope en bactériologie.*

Appliqué à l'étude des microbes, le microscope sert principalement à deux usages : l'observation des colonies et l'examen des préparations. Le microscope.

Pourvu d'un faible grossissement (en-dessous de 50 diamètres), il nous permettra d'étudier le développement des colonies sur plaques d'agar. Muni d'une lentille à immersion (donnant plus de 600 diamètres), il se prêtera à l'examen des bactéries colorées dans les préparations.

En passant en revue les différentes parties d'un microscope combiné spécialement en vue de ces recherches, nous avons à considérer :

1° L'*oculaire* : Celui-ci doit être faible

(n° 2 ou 3 de Huyghens), afin de laisser aux images toute leur netteté et de ne pas obscurcir l'ensemble de la préparation. On se servira très exceptionnellement de numéros plus forts;

2° L'*appareil d'éclairage* : Le système condensateur d'Abbe est absolument nécessaire. Il sera pourvu de préférence d'un diaphragme à iris, instantanément transformable;

3° L'*objectif* : On le choisira à immersion homogène dans l'huile de cèdre. L'indice de réfraction de ce milieu étant de 1.515, se rapproche de celui du verre : certains rayons lumineux, concentrés par l'appareil d'Abbe, sont divergents à leur sortie de la préparation dans les montures à sec; ils peuvent être utilisés par l'observateur grâce à l'immersion et rentrent dans l'axe optique. Ils contribuent donc à rendre la préparation plus claire.

Après chaque observation, il faut avoir soin de passer une peau de chamois sur l'objectif afin d'enlever toute trace d'huile, celle-ci se desséchant rapidement (en cas d'accident, laver à la benzine). La lentille frontale des objectifs à immersion devant être amenée très près du deckglass pendant l'observation (leur angle d'ouverture étant de 170 degrés et plus), il importe de manier ces instruments avec prudence et d'abaisser le tube avec précaution;

4° La *monture* (statif) peut être fixe ou à charnière et réversible. Il importe que la platine soit suffisamment grande pour pouvoir porter une plaque de Petri ;

5° La *longueur* du tube n'est pas sans importance, car les objectifs à immersion sont corrigés pour un tube de 0m,176. Un tube plus ou moins long donnerait des images beaucoup moins nettes;

6° Pour les observations à faire à la lumière, le bec Auer est une bonne source à condition de faire passer les rayons à travers un globe (ballon) renfermant une solution étendue de sulfate de cuivre ammoniacal;

7° Les combinaisons suivantes sont les plus recommandables pour les recherches courantes:

I. *Zeiss, à Iéna :* Statif IVa, ocul. 2; objectifs A et 1/12, revolver (prix : 600 francs).

II. *Leitz à Wetzlar :* Statif IIa, ocul. 2; objectifs 2 et 1/12, revolver (prix : 320 francs).

III. *Nachet, à Paris :* Statif modèle d'étudiant, ocul. 2 et grand champ; objectifs 2 et 1/12, revolver (prix : 290 francs).

II. — *La Préparation.*

A. La substance à examiner est portée en quantité minime sur un deckglass au moyen

La préparation.

d'un fil de platine recourbé en anse fermée (öse des Allemands). On étale soigneusement le liquide suspect (pus, crachats, etc.) dilué au besoin dans une très petite gouttelette d'eau stérile, sur le couvre-objet. On laisse *sécher* à l'air libre ou, pour aller plus vite, on passe rapidement au-dessus d'un bec de Bunsen, à $0^{m},25$ au moins au-dessus de la flamme et en tenant la préparation en main (ce qui évite la carbonisation).

B. Après la dessiccation on procède à la fixation, qui est l'opération importante : on passe le deckglass, maintenu dans une pince spéciale (pince bactériologique de Cornet), dans la flamme d'un bec de Bunsen. Il est préférable de tenir le deckglass verticalement et de le passer très rapidement dans la flamme de haut en bas : on a moins de chance de brûler la préparation de cette façon qu'en tenant le deckglass horizontalement, comme on le recommande généralement.

C. Après avoir fixé la préparation on procède à la coloration : dans ce but, on verse quelques gouttes du colorant sur le deckglass, on passe ce deckglass, recouvert sur toute sa surface de matière colorante, dans la flamme d'un bec de Bunsen ou d'une lampe à alcool jusqu'à production de vapeurs (éviter l'ébullition).

On se sert d'un colorant qui peut servir indif-

féremment pour toutes les bactéries ; c'est le ***bleu de Löffler*** dilué, dont la formule est :

Sol. alcool. sat. de bleu de méthylène, 30 gr.
Eau, 100 gr.
Potasse caustique 1 %, 1 gr.

Ce colorant universel peut servir pour tous les cas. Il y a cependant des circonstances où il est préférable de profiter des avantages d'une méthode spéciale de coloration, dite ***méthode de Gram***, qui permet de différencier certaines bactéries les unes des autres.

Méthode de Gram.

La méthode de Gram, basée sur la propriété que possède l'iode de fixer le violet de gentiane sur certains microbes et pas sur d'autres, se réduit à quatre opérations :

1° Coloration à chaud (2 minutes) sur le deckglass au moyen du violet de gentiane aniliné :

Violet de gentiane (sol. alcool. sat.), 10 gr.
Eau d'aniline, 90 gr.

(L'eau d'aniline se prépare en mélangeant à 100 gr. d'eau distillée 3 gr. d'huile d'aniline : on agite fortement et on filtre sur un papier humide.)

Cette solution ne se conserve pas (1) ;

2° Fixation du colorant par l'iode ioduré

(1) On peut préparer une solution qui se conserve plus longtemps de la façon suivante :
Sol. alcool. sat. de violet, 10 gr.
Sol. phéniquée 2 1/2 p. c., 90 gr.

(1 minute); on rejette l'excès de colorant et on ajoute le liquide suivant ***sans laver*** :

Solution iodo-iodurée : Iode, 1 gr.; Iod. de potassium, 20 gr.; Eau dist., 300 gr.

On laisse agir jusqu'à coloration foncée;

3° On décolore par l'alcool absolu (quelques minutes);

4° On colore le fond par l'éosine ou par une solution très diluée de fuchsine.

En opérant de cette façon, les bactéries qui prennent le Gram restent colorées en violet foncé, tandis que les autres microbes apparaissent en rose.

Retenons, au point de vue pratique, que tous les microcoques prennent le Gram excepté le Gonocoque et qu'aucun bacille ne reste coloré par cette méthode excepté la diphtérie, le charbon et le tétanos.

III. — *L'Examen de la préparation.*

Une fois colorée, la préparation peut être examinée aussitôt : il suffit d'enlever l'excès de matière colorante par un lavage rapide à l'eau, de retourner le deckglass chargé d'eau sur un porte-objet bien propre, d'essuyer l'excès d'eau avec du papier buvard, de déposer à la surface du deckglass une goutte d'huile de cèdre et

d'abaisser le tube du microscope. Il est utile de se rappeler :

Précautions pour l'examen.

1° Que la face supérieure du deckglass doit être bien sèche avant d'y déposer l'huile de cèdre ;

2° Que le tube du microscope doit avoir une longueur déterminée et qu'il doit être abaissé doucement jusqu'au niveau de la préparation ;

3° Que le diaphragme, sous l'appareil d'Abbe, doit être ouvert complètement ;

4° Qu'il faut mettre au point une fois que l'objectif touche l'huile avec la vis micrométrique, et jamais avec la crémaillère ;

5° Qu'il faut s'assurer si le miroir réflecteur est bien dirigé et s'il donne le maximum de lumière.

Lorsque la préparation doit être conservée, au lieu de retourner le deckglass après lavage sur le porte-objet, on le sèche doucement entre deux feuilles de papier buvard, on le passe rapidement, en le tenant dans les doigts, au-dessus de la flamme pour compléter la dessiccation et on le dépose sur le porte-objet qu'on a recouvert préalablement d'une gouttelette de baume de Canada, dissous dans du xylol.

CHAPITRE II

La Technique bactériologique.

I. — *Instruments et appareils.*

Instruments et appareils. Toutes les opérations pratiquées en bactériologie doivent être naturellement faites dans des conditions d'aseptie rigoureuse. Tous les instruments devront être désinfectés avant l'emploi. On devra se servir d'ustensiles absolument stériles et se rappeler constamment que l'air qui nous entoure est chargé de microbes qui, à la moindre inattention de l'opérateur, viendront contaminer les milieux de culture et les rendre impropres aux recherches. Le but de la plupart des expériences bactériologiques est d'arriver à l'isolement d'une espèce microbienne afin de pouvoir étudier ses caractères morphologiques, biologiques et pathogènes,

Cette aseptie absolument rigoureuse que nous exigeons dans nos travaux nous pouvons l'obtenir par différents procédés qui se réduisent à cinq méthodes principales :

1° La flamme d'un brûleur de Bunsen; 2° la chaleur sèche à 150 degrés et au-dessus; 3° la chaleur humide à 120 degrés; 4° la chaleur à 100 degrés et 5° la bougie Chamberland ou Berkefeld (procédé mécanique).

Stérilisation.

1° *Flamme.* On se servira du bec de Bunsen pour stériliser les aiguilles de platine, les petits instruments (ciseaux, scalpels) qui auront été contaminés;

2° *Chaleur sèche.* On utilisera la chaleur séche à 150 degrés pour désinfecter tous les objets en verre (ballons, flacons, pipettes, etc.). Les récipients seront fermés avec un bouchon d'ouate hydrophile avant de les déposer à l'étuve sèche. L'air, qui en est chassé pendant le chauffage, rentre dans les flacons après refroidissement et les bactéries en suspension sont arrêtées sur l'ouate. Les ustensiles divers (pipettes, seringues), qui sont stérilisés d'avance, doivent être enveloppés jusqu'au moment de l'emploi dans du papier buvard et déposés tels quels dans l'appareil. L'instrument employé pour cet usage est une grande boîte en tôle, à doubles parois et munie à sa partie

inférieure d'un fort brûleur de Bunsen. Le premier ferblantier venu peut construire cet appareil. Il faut éviter de dépasser 150 degrés, car au-dessus de cette température on voit l'ouate commencer à brunir. Les objets séjournent dans l'étuve sèche trois quarts d'heure ou une heure. Le réglage se fait directement par la flamme ou au moyen d'un thermo-régulateur spécial ;

3º *Autoclave*. La chaleur humide à 120 degrés est fournie par l'autoclave Chamberland ou marmite de Papin, qui consiste en un récipient solide en cuivre au fond duquel se trouve une petite quantité d'eau. Le couvercle de l'appareil est solidement appliqué au moyen de boulons. On chauffe avec une couronne de becs de Bunsen et lorsque la vapeur atteint une pression de 1 atmosphère (120 degrés) on arrête le chauffage. Le séjour des objets à l'autoclave varie de un quart d'heure à une heure. C'est un moyen de stérilisation très sûr. Il est employé pour tous les milieux de culture : et il a l'avantage de fonctionner très rapidement. C'est un appareil dispendieux qui doit être réservé aux laboratoires. L'appareil suivant rend d'aussi grands services ;

4º *Poêle à vapeur*. La chaleur humide à 100 degrés est produite par le stérilisateur de

Koch, dit « poêle à vapeur » : C'est un récipient cylindrique contenant de l'eau qui est chauffée à 100 degrés. La vapeur qui se dégage échauffe les récipients déposés dans l'appareil et s'échappe par une ouverture centrale pratiquée dans le couvercle. Un système à niveau constant permet d'appliquer l'instrument à une distribution d'eau en amenant un courant continu qui permet de laisser brûler l'appareil en tout temps sans surveillance. La stérilisation obtenue de cette façon est moins sûre que celle que donne l'autoclave. Les objets doivent séjourner dans le poêle à vapeur pendant une heure, deux ou trois jours consécutifs. Certaines spores, qui n'auraient pas été tuées à la première opération, peuvent ainsi végéter et être détruites la seconde fois. Le praticien pourra se faire construire un appareil de ce genre à peu de frais. (Cylindre de $0^m,40$ de hauteur, $0^m,20$ de diamètre, avec un fond en toile métallique à $0^m,10$ de l'extrémité inférieure. Couvercle conique avec un trou central.)

Stérilisation fractionnée. Les objets qui ne supportent pas 100 degrés, peuvent être portés pendant plusieurs jours à 55 degrés. On répète cette opération pendant cinq à six jours durant deux heures. Ce mode de stérilisation est réservé pour les liquides albuminoïdes dont il faut éviter le chauffage trop élevé (sérum, etc.) ;

5° Un procédé de stérilisation mécanique nous est fourni par les bougies de porcelaine dont les pores sont suffisamment étroits pour empêcher le passage des bactéries. Ces bougies servent à filtrer l'eau d'alimentation dans certains pays et même dans les laboratoires; on s'en sert pour filtrer des liquides qu'on ne désire pas chauffer : lorsque ces liquides sont assez épais, on peut les faire passer sous pression au moyen d'une pompe d'Arsonval.

II. — *Les Milieux de culture.*

Milieux de culture.

Les milieux nutritifs les plus usités en bactériologie sont le bouillon de viande, l'agar ou gélose et la gélatine.

A. Le *bouillon* est préparé en hachant 500 grammes de viande, sans graisse, qu'on fait bouillir dans un litre d'eau. On filtre, on ajoute 1 p. c. de peptone et 1/2 p. c. de sel, on neutralise au moyen du Co^3 Na. Refiltrer (le papier bleu de tournesol doit rester bleu), stériliser et essayer à nouveau la réaction qui change souvent après le chauffage.

B. L'*agar* est préparé en additionnant le bouillon de 2 p. c. d'agar-agar, un lichen (*Gelidium spiniforme*) qu'on trouve dans le commerce, plus ou moins purifié. Ce milieu est

celui qui sert le plus généralement. Il a la propriété de ne fondre que vers 90 degrés et, en refroidissant, il devient solide vers 50 degrés.

C. La *gélatine* est préparée de la même façon que l'agar : on ajoute au bouillon 10 p. c. de gélatine. Ce milieu fond vers 25 degrés. Il doit donc être conservé dans des étuves à température constante ne dépassant pas 20 degrés.

L'agar et la gélatine sont filtrés dans le poêle à vapeur.

On a décrit un grand nombre d'autres méthodes de culture des bactéries; nous avons signalé ici celles dont on se sert le plus fréquemment.

Préparation des tubes.

La *préparation des tubes de culture* (bouillon, gélatine, agar) est excessivement simple : les tubes sont bouchés et stérilisés. On emploie le plus des tubes contenant de 2 à 4 c. c. de bouillon, introduits au moyen d'une pipette. L'agar doit être mis en tube avec précaution afin de ne pas souiller l'orifice auquel le bouchon d'ouate resterait collé.

Les plaques.

La *préparation des plaques* n'offre rien de spécial : pour les plaques d'agar, on se sert en général de plaques préparées d'avance, en ce sens que le milieu a été répandu dans la plaque plusieurs jours avant l'emploi. Les plaques de gélatine se préparent souvent extemporanément.

Le sérum solidifié n'est presque plus employé.

Nous verrons qu'on le remplace facilement par des milieux tout aussi favorables à la croissance des bactéries (diphtérie).

Le liquide d'ascite peut rendre des services ; il sera recueilli aseptiquement et stérilisé par la méthode fractionnée.

III. — *Les Méthodes de culture.*

Isolement des bactéries.

Lorsqu'on désire isoler les bactéries contenues dans un liquide pathologique, du pus, par exemple, la première opération consiste à faire une ou plusieurs cultures sur plaques :

On se sert à cet effet de boîtes de verre de $0^{m},10$ de diamètre à large couvercle, dites *plaques de Petri*, dans lesquelles on a versé, après stérilisation, quelques centimètres cubes d'agar chauffé. Ces plaques se conservent assez longtemps.

Au moyen d'une aiguille de platine, dont l'extrémité est terminée en öse, on ensemence une gouttelette de liquide à la surface de l'agar en découvrant la plaque et en la tenant *verticalement* (si on la tient horizontalement les bactéries de l'air viennent se déposer sur le milieu), on trace une spirale à la surface de l'agar en appuyant l'aiguille de platine très légèrement pour ne pas entamer l'agar.

Après avoir ensemencé la plaque, on la dépose à l'étuve, le ***couvercle en bas***, donc retournée, pour éviter l'évaporation du milieu et le dépôt de gouttes d'eau à la face inférieure du couvercle.

Colonie microbienne.

Au bout de vingt-quatre heures, chaque microbe déposé à la surface de l'agar au moyen du fil de platine, a donné lieu à la formation d'une ***colonie microbienne***, amas de microbes arrondi et isolé. Cette colonie microbienne est observée à l'œil nu, puis au microscope, à un faible grossissement. La main droite armée d'un très mince fil de platine monté sur tige de verre, on s'efforce de ***pêcher*** cette colonie en prenant comme point d'appui l'angle postérieur droit de la platine du microscope et en tenant l'aiguille à la façon d'un porte-plume. Cette opération est très délicate mais de la plus haute importance : dans chaque laboratoire de bactériologie elle se répète cinquante fois par jour.

Le procédé de culture sur plaque est donc une méthode d'isolement des bactéries.

Pour conserver une espèce microbienne isolée et étudier en détails ses caractères biologiques, on fait des cultures en TUBES (bouillon, agar, gélatine).

Les microbes pêchés sur les plaques avec le fil de platine sont introduits aseptiquement dans

un tube contenant 2-3 centimètres cubes de bouillon. On peut encore promener l'aiguille à la surface d'un tube d'agar.

Culture des anacrobies.

Certains microbes ne se développent pas en présence de l'oxygène; leur culture nécessite une technique spéciale.

La culture des *microbes anaérobies* se fait de deux façons : ou bien en empêchant l'accès de l'oxygène dans la culture ou bien en pratiquant cette culture dans un autre gaz, notamment l'hydrogène ou le gaz d'éclairage.

A. *Méthodes sans oxygène.*

a) On peut obtenir une culture en piquant les bactéries au moyen de l'anse de platine dans l'épaisseur de la substance de culture. Pour plus de précautions on recouvre encore le milieu d'un peu d'huile ou de paraffine;

b) On peut également ensemencer des plaques ou des tubes comme d'habitude et les conserver dans le vide sous une cloche. Celle-ci peut être déposée à l'étuve à 37 degrès.

B. *Méthode à l'hydrogène.*

Cette méthode convient surtout pour les cultures en bouillon. On fait passer un courant d'hydrogène dans le liquide après ensemencement et on ferme à la lampe après avoir eu soin de paraffiner le bouchon de caoutchouc fermant le tube ou le ballon. Le tube qui amène le gaz

doit plonger jusqu'au fond du liquide. Pour éviter les explosions, il est bon d'employer comme tube de sortie un petit tube coudé avec deux ampoules dont l'une est remplie de mercure. Lorsque le ballon est penché, le mercure se place dans l'une des ampoules et permet la sortie du gaz ; dans la position verticale, le mercure retombe dans le tube coudé et vient obturer complètement celui-ci. L'hydrogène est fourni par un appareil de Kipp avec deux flacons laveurs d'acétate de plomb et d'acide pyrogallique.

Isolement des microbes anaérobies.

La plupart de ces espèces supportent une température de 60 degrés, pendant une demi-heure, grâce à leurs spores. On peut donc utiliser cette propriété pour séparer du liquide à analyser des microbes qui empêchent l'identification des anaérobies et qui sont tués à cette température. On peut d'emblée obtenir une culture pure de cette façon.

Les anaérobies pathogènes pour l'homme sont le tétanos, le charbon symptomatique et le bacille de l'œdème malin.

Résumé.

Quels sont, en résumé, les instruments indispensables pour pratiquer une analyse bactériologique?

1° Le microscope et ses accessoires;

2° Quelques verreries : porte-objets, deckglass, plaques et tubes, ballons;

3° Quelques réactifs colorants : bleu de Löffler, Ziehl, Gram ;

4° Pour les cultures :

a) Substances nutritives (bouillon, agar, gélatine) ;

b) Un poêle à vapeur pour stériliser les milieux nutritifs ;

c) Une étuve sèche pour stériliser les verreries ;

d) Une étuve à température constante à 37 degrés (modèle simple, chauffage au pétrole).

On voit donc qu'il faut en réalité peu de chose pour monter un laboratoire de bactériologie clinique.

Expérimentation :

L'expérimentation sur les *animaux* se pratique principalement sur les souris, les cobayes et les lapins.

1° Souris.

Souris. Les souris blanches constituent un excellent réactif pour déceler la virulence ou même la présence des streptocoques et des pneumocoques.

Les injections se pratiquent sous la peau du dos avec des seringues à piston d'asbeste facilement stérilisables. Il est prudent de ne pas injecter plus de 2 grammes de liquide à la fois.

Les souris servent également à démontrer la présence du bacille du tétanos dans du pus ou dans des échantillons pathologiques : l'inoculation se pratique alors à la base de la queue

et les symptômes typiques s'observent déjà après vingt-quatre heures (immobilité, yeux fermés, contractures, etc.).

On manie le plus facilement les souris en les faisant saisir à la nuque par un aide muni d'une longue pince qu'il tiendra de la main gauche tandis que la main droite étalera l'animal sur une table en tirant légèrement par la queue.

Les cobayes sont beaucoup employés également. On peut leur pratiquer différentes opérations dont les principales sont : 2° Cobayes.

1° *Injections sous-cutanées* : L'animal est tenu par un aide qui de la main droite relève les pattes de devant contre la tête de l'animal et prend les deux pattes postérieures dans la main gauche. Il présentera le dos de l'animal à l'opérateur. Les injections se pratiquent au moyen de seringues à piston d'asbeste. Il faut avoir soin de suivre les progrès de l'injection avec la main qui tend la peau, afin de constater si le liquide a été répandu dans le tissu cellulaire sous-cutané ;

2° *Injections intra-péritonéales* : L'animal est tenu horizontalement par un aide. On pratique une très petite boutonnière dans la peau du ventre et au moyen d'une canule mousse (qui évite les blessures de l'intestin) on passe facilement à travers les muscles de l'abdomen. L'injection est poussée lentement. Inutile de refermer la plaie produite ;

3° *Injections intra-veineuses* : Mettre une veine jugulaire à nu et, après ligature provisoire, introduire une canule qu'on fixe à la paroi du vaisseau. L'injection se pratique dans le sens du courant sanguin;

4° *Injections intra-stomacales* : On peut, dans certaines circonstances, assez rares, il est vrai, désirer expérimenter au moyen des inoculations intra-stomacales (choléra, typhus, etc.). Il suffit de passer une sonde molle dans l'estomac du cobaye, d'injecter une légère quantité de carbonate de soude pour neutraliser l'acidité du suc gastrique et d'introduire ensuite la culture. On a eu soin d'immobiliser l'intestin par une injection intra-péritoniale de 1 c. c. de teinture d'opium (méthode de Koch).

3° Lapins. Les *lapins* subissent les mêmes manipulations : injections intra-veineuses (dans les veines de l'oreille), injections sous-cutanées et injections intra-péritonéales.

Dans certains cas (tuberculose) l'inoculation dans la chambre antérieure de l'œil pourra rendre des services. Les progrès de la lésion se suivent parfaitement à l'œil nu.

CHAPITRE III

L'Examen bactériologique du pus.

I. — *Les Suppurations en général.*

La suppuration est considérée en général comme la réaction de l'organisme contre certaines substances nuisibles (composés chimiques, bactéries, produits bactériens).

Expérimentalement, on peut produire de la suppuration avec un grand nombre de substances aseptiques; mais en clinique, la suppuration est toujours liée à la présence de microbes ou de toxines microbiennes.

Les véritables agents de la suppuration chez l'homme sont les staphylocoques (microcoques réunis en amas, en grappes) et les streptocoques (microcoques en chaînes).

suspects de tuberculose (inoculation intra-péritonéale au cobaye), de tétanos (inoculation sous-cutanée à la souris) et de pneumocoque (également à la souris).

II. — *Les Staphylocoques.*

Ces micrococques, très répandus dans la nature, ont été décrits en 1881 par Ogston.

Examen direct :

Caractères morphologiques.

Coccus arrondi, de 1 μ de diamètre. — Ils se présentent en amas irréguliers, en grappes. — On peut les colorer par toutes les couleurs d'aniline; ils conservent très bien le Gram.

Cultures :

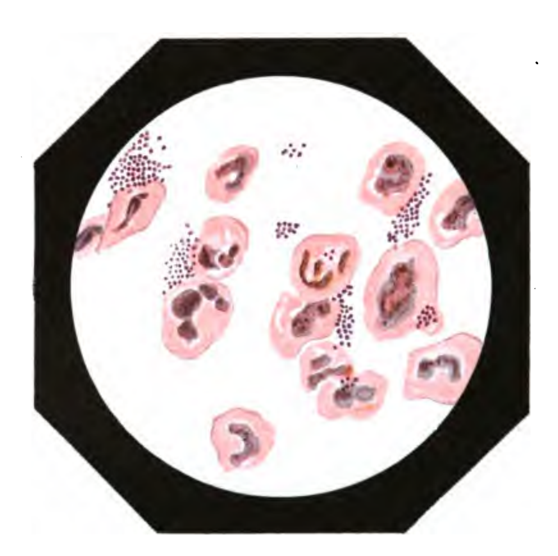
Caractères biologiques.

En bouillon : ce microbe pousse très facilement. Il trouble fortement le liquide et produit un dépôt abondant au fond du tube. Cultivé sur gélatine, il liquéfie ce milieu rapidement. Sur agar, il donne des colonies se développant en quelques heures D'après l'aspect de ces colonies sur gélose, on distingue :

1° Le staphylocoque doré, produisant des colonies d'un beau jaune d'or;

2° Le staphylocoque blanc, donnant des colonies blanches, laiteuses;

3° Le staphylocoque citrin, donnant des colonies jaune pâle



STAPHYLOCOQUES DANS DU PUS (GRAM)



STREPTOCOQUES EN CULTURE PURE (FUCHSINE)

Les staphylocoques blanc et doré se trouvent aussi fréquemment l'un que l'autre dans les suppurations.

La résistance du staphylocoque est très grande : ce microbe supporte une dessiccation prolongée et sert fréquemment comme contrôle dans les expériences de désinfection.

Il produit une toxine dans les bouillons de culture, qui résiste bien à la chaleur ; on a même essayé de reproduire des suppurations avec un extrait des cultures (phlogosine).

Inoculations : Caractères pathogènes.

a) *Chez l'homme*, le staphylocoque est le microbe habituel du pus.

Il produit les furoncles, l'anthrax, certains abcès ; on le retrouve fréquemment dans les angines, les otites, le pus de l'empyème. Il peut donner lieu à des métastases dans les organes internes. C'est l'agent étiologique habituel des ostéomyélites ;

b) *Chez les animaux*, le staphylocoque produit des abcès, spécialement en inoculation sous-cutanée chez le chien.

Il est pathogène pour le lapin ; les effets obtenus varient d'après l'endroit de l'infection : sous la peau, il produit généralement des abcès, dans le péritoine, il donne des péritonites rapidement mortelles et en inoculation intra-

veineuse, il peut produire des lésions valvulaires du cœur.

Le staphylocoque a peu d'action sur le cobaye.

L'immunité contre le staphylocoque n'a pas été beaucoup étudiée : on parvient à immuniser activement, au moyen de doses progressivement croissantes, la plupart des animaux de laboratoire. L'immunité passive est moins connue : tous les essais de sérothérapie ont échoué jusqu'ici.

III. — *Les Streptocoques.*

Les streptocoques ont une importance plus grande que les staphylocoques au point de vue de la pathologie infectieuse, les affections qu'ils produisent étant généralement plus graves. Ces microbes ont été bien décrits par Ogston en 1881 et Fehleisen en 1883.

Caractères morphologiques.

Examen direct :

Coccus arrondi, de dimensions variables (1 μ et plus); se présentent en chaînes plus ou moins allongées; se colorent très facilement et prennent le Gram.

Leur différenciation en espèces distinctes est encore à l'étude.

Caractères biologiques.

Cultures :

En bouillon : Croissance abondante, surtout

dans le bouillon glucosé. Sédiment floconneux plus ou moins abondant, le liquide restant généralement clair ou à peine troublé.

Pour conserver la virulence du streptocoque en milieu liquide, on recommande de le cultiver dans le mélange suivant :

Sérum humain, 2 parties;
Bouillon peptonisé, 1 partie (Marmorek).

Sur gélatine, donne de petites colonies granuleuses. Ce milieu n'est *pas* liquéfié.

Sur agar, petites colonies hyalines; parfois petites colonies très foncées, granuleuses.

Le streptocoque résiste assez bien à la dessiccation.

La virulence se maintient par des passages sur les animaux sensibles (lapins).

Caractères pathogènes.

Inoculations :

Chez l'homme le streptocoque est l'agent étiologique de l'érysipèle. On le rencontre dans certains abcès, dans les angines, les endocardites, etc. Il peut envahir l'organisme et produire des septicémies graves (infection puerpérale) ; c'est l'agent habituel des infections mixtes dans la tuberculose pulmonaire.

Chez les animaux, l'action varie d'après la virulence.

En général, le lapin et la souris sont très sensibles à son action.

Immunité.

L'immunité antistreptococcique a fait l'objet d'un grand nombre de travaux (Marmorek (1895).

Le sérum obtenu par l'inoculation de doses croissantes de bouillon virulent chez le cheval semble doué de propriétés bactéricides spécifiques.

Les résultats de la sérothérapie antistreptococcique chez l'homme ont été peu encourageants jusqu'ici, ce qui tient en grande partie à la mauvaise qualité des sérums qu'on trouve généralement dans le commerce.

IV. — *Le Gonocoque.*

Le gonocoque a été décrit par Neisser en 1879. C'est l'agent spécifique de la blennorrhagie.

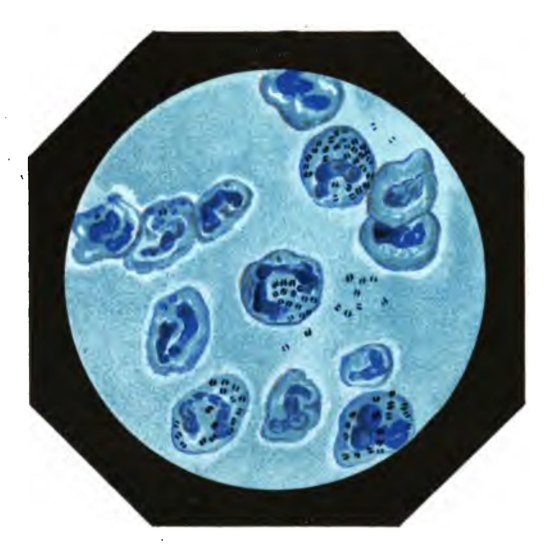
Caractères morphologiques.

Examen direct :

Son aspect est typique : Petits micrococques présentant la forme de deux haricots réunis et se regardant par leur face concave. Ils mesurent 1 μ de long sur 0.5 à 0.6 μ de large.

Les gonocoques se trouvent en abondance dans le pus spécifique, tantôt en amas dans le liquide, tantôt à l'intérieur des globules blancs. Ils se *décolorent* par la méthode de Gram.

Ce caractère est très important, car il permet la différenciation du gonocoque et des



GONOCOQUES DANS DU PUS BLENNORRHAGIQUE



EXSUDAT DIPHTÉRIQUE (GRAM)
(STAPHYLOCOQUES, STREPTOCOQUES ET BACILLES DE LŒFFLER)

espèces similaires non spécifiques qu'on rencontre parfois dans les sécrétions purulentes.

Précautions pour l'emploi de la méthode de Gram :

Colorer la préparation trois minutes à froid avec le violet, laisser agir l'iode trois minutes, puis décolorer à l'alcool au moins une minute ou laisser agir pendant vingt secondes l'alcool-acétone (acétone 1 et alcool 5). Laver et colorer à l'éosine ou à la vésuvine (solution alcoolique à 10 p. c. dans de l'eau au 1/3).

Le gonocoque se colore très bien par la méthode de Neisser (bleu de méthylène et éosine) :

1° Solution alcoolique d'éosine (à chaud);
2° Sécher;
3° Solution alcoolique de bleu de méthylène ;
4° Laver à l'eau;

Les gonocoques et les noyaux sont colorés en bleu ; le protoplasme en rose.

Caractères biologiques.

Cultures :

Le gonocoque ne se développe pas sur les milieux ordinaires.

Les méthodes suivantes ont été recommandées :

A. *Milieu de Bumm*. Sérum humain coagulé. (Les colonies restent fort petites.)

B. *Milieu de Wertheim*. Sérum humain

1 partie; agar peptonisé, 2 parties. (Croissance très faible, peu favorable)

C. *Milieu de Kiefer*. Mélange d'agar peptonisé-glycériné 1 p. c. 3 parties et liquide d'ascite 1 partie. (On constate un certain développement après quarante-huit heures de séjour à l'étuve.)

D. *Milieu de Christmas*. Sérum de lapin coagulé. (Croissance médiocre, mais non moins abondante que sur serum humain.)

E. *Milieu de Wassermann*. Sérum de porc et nutrose : On mélange 15 gr. de serum de porc, 30 gr. d'eau, 2 gr. de glycérine et 1 gr. de nutrose

On fait bouillir pendant vingt minutes.

On ajoute parties égales d'agar peptonisé maintenu à 50°.

Caractères pathogènes.

Inoculations :

Tous les animaux sont réfractaires à l'inoculation urétrale ou conjonctivale. Chez la souris on a obtenu une péritonite.

On le retrouve dans toutes les affections blennorrhagiques (urètre, vessie, vagin). Sa présence dans les globules blancs est un signe favorable : phagocytose. Il peut produire des complications par métastase (arthrites, etc.) ou par transport direct (conjonctivite, etc.).

Au point de vue médico-légal, le diagnostic

de la présence du gonocoque est difficile : la vulvo-vaginite des petites filles serait due à un microbe identique. Dans ce cas, le gonocoque peut être transmis par contagion indirecte sans contact avec un blennorrhagique. Il résiste bien à la dessication.

L'immunité est inconnue.

Récolte et examen du pus blennorrhagique. Pour examiner du pus suspect, laver le méat avec de l'eau stérile et recueillir une goutelette avec une aiguille de platine ou un instrument quelconque passé au préalable dans la flamme. Frotter sur un deckglass et laisser sécher. L'examen peut se faire ultérieurement.

Dans l'état actuel de nos connaissances, on peut considérer tout diplocoque à forme spéciale en haricot et se décolorant complètement par le Gram comme du gonocoque. Le micrococcus subflavus de Bumm et le micrococcus albicans qui ont été retrouvés dans le mucus vaginal normal restent colorés par cette méthode; au point de vue morphologique, ils sont identiques au gonocoque.

Pour isoler ce microbe du pus et en obtenir des cultures, il faut ensemencer le liquide sur du serum de lapin coagulé.

Après douze heures, on constate déjà la présence de petites colonies transparentes, d'aspect

visqueux. Les autres bactéries qui se trouvaient dans le pus ne sont pas encore développées.

Les cultures liquides se font le plus facilement dans un mélange de bouillon ordinaire (3 parties) et de liquide d'ascite (1 partie).

Méningocoque.

Signalons en passant un microcoque qui ressemble beaucoup au gonocoque et qui est considéré comme l'agent étiologique de la ***méningite cérébro-spinale épidémique*** (Weichselbaum). Ce diplocoque se décolore également par la méthode de Gram. Il se trouve en amas intracellulaires et pousse facilement sur agar glycériné en donnant des colonies arrondies granuleuses, bien développées en quarante-huit heures.

Cette affection est très rare dans notre pays.

V. — *Le Bacille du chancre mou.*

Bacille de Ducrey.

Ce bacille a été décrit en 1889 par Ducrey et peut être considéré comme l'agent étiologique du chancre mou.

Il a une grande importance puisqu'il permet de reconnaître un chancre mou d'un chancre syphilitique.

Caractères morphologiques :

Streptobacilles de 2 μ de long sur 1 μ de large, se présentant généralement en longues

chaînes. Se décolore par la méthode de Gram. On le colore facilement dans le pus par le bleu de Löffler.

Dans les coupes (chancre excisé, on peut le colorer d'après la méthode de Unna :

1° Coloration au bleu de méthylène polychrome;

2° Laver à l'eau;

3° Porter dans un mélange d'éther et de glycérine;

4° Laver à l'eau et à l'alcool.

Caractères biologiques :

On n'est pas parvenu à cultiver ce bacille.

Caractères pathogènes :

Peut être inoculé au singe et au lapin. (Nicolle).

VI. — *Suppurations dues à l'actinomycose.*

L'actinomycose est une affection se transmettant des bovidés à l'homme et caractérisée par la présence, dans le pus, d'un végétal appartenant au groupe des streptothrix. (Intermédiaires entre les hyphomycètes ou moisissures et les bactéries.) Certaines formes de ce végétal rappellent les filaments qu'on a décrit dans quelques cultures de tuberculose et de diphtérie. **Actinomycose.**

Caractères morphologiques :

L'actinomycose se présente dans le pus sous forme de grains jaunes, déjà visibles à l'œil nu. Chaque granulation est formée d'une masse centrale d'où partent des rayons divergents terminés par des renflements en massue.

Se colore très bien par la méthode de Gram.

Caractères biologiques :

L'actinomycose se cultive sur agar glycériné. Sa croissance est lente; les colonies épaisses, sèches, blanches sont très adhérentes au milieu. Pour l'isoler dans le pus, il est utile de le cultiver dans le vide (anaérobie facultatif). On obtient souvent d'emblée une culture pure.

Caractères pathogènes :

Chez l'homme, l'actinomycose peut occasionner des lésions très diverses, généralement localisées à la face (mâchoire).

Chez les animaux, cette affection se rencontre le plus souvent à la mâchoire inférieure du bœuf.

VII. — *Le Tétanos.*

Tétanos.

Décrit en 1884 par Nicolaïer, le bacille du tétanos est un anaérobie vrai.

Caractères morphologiques :

Bacilles allongés, de 4-5 μ, munis à une extrémité d'une spore sphérique, leur donnant la forme d'un clou.

Restent colorés par la méthode de Gram.

Caractères biologiques :

Les spores du tétanos résistant à une température de 80 degrés pendant six heures au moins, on a là un bon moyen d'isoler le bacille en culture pure.

Dans le bouillon, le bacille pousse rapidement si le milieu est maintenu en atmosphère d'hydrogène. Le liquide se trouble très rapidement. Odeur infecte.

Le bouillon renferme la toxine. (Brieger.) On connaît bien deux éléments de cette toxine : la tétanolysine (substance hémolytique, dissolvant les globules rouges) et la tétanospasmine (toxine vraie).

En piqûre dans la gélatine purgée d'air, le tétanos se développe en liquéfiant lentement le milieu ; il se dégage des bulles gazeuses. Cultivé en épaisseur dans l'agar, le tétanos produit des fentes dans la gélose avec dégagement de gaz odoriférants.

On peut encore cultiver le bacille du tétanos à l'air libre, en ajoutant au bouillon un peu de sulfure de soude (5 gouttes de la solution à 1 p.c. par tube de 10 gr. de bouillon).

Caractères pathogènes :

Le tétanos est le type de la maladie toxique : infection locale (suppuration) et intoxication générale.

Les souris, les rats et les cobayes sont très sensibles.

Immunité : Bien connue depuis les travaux de Behring et Kitasato et ceux de Roux et Vaillard. On immunise très facilement les chevaux en vue d'obtenir un serum antitoxique, par l'injection de doses progressivement, mais lentement croissantes de toxine tétanique.

Recherche du bacille tétanique : *a*) Dans le pus, on peut pratiquer l'examen direct (méthode de Gram) et grâce à leur forme spéciale, on reconnaîtra souvent d'emblée la présence des bacilles spécifiques. Confirmer cet examen par l'inoculation sous-cutanée à la souris (à la base de la queue);

b) Dans les examens du sol, où le tétanos est associé à un grand nombre d'autres bactéries, on fait une émulsion qu'on chauffe à 80° et qui donne souvent le tétanos en culture pure. Il faut toujours contrôler l'examen des cultures par l'inoculation aux animaux, qui seule donne un résultat certain.

VIII. — *Suppurations produites par la tuberculose, le pneumocoque, le bacille typhique et le bacterium coli.*

Le bacille de la tuberculose produit fréquemment des suppurations chroniques, des abcès froids, des ostéites, etc. **Tuberculose.**

Il est fort difficile de démontrer sa présence dans le pus. Les cultures ne donnent pas plus de résultat que l'examen des préparations colorées.

La méthode de choix est l'inoculation au cobaye (péritoine) ou au lapin (chambre antérieure de l'œil).

Le *pneumocoque* se rencontre dans le pus de certaines otites, dans quelques conjonctivites, même dans certaines arthrites. **Pneumocoque.**

Il peut être décelé assez aisément par l'examen direct au moyen de la méthode de Gram. En cas de doute, l'inoculation à la souris d'une goutte de liquide suspect est préférable à l'isolement par les cultures.

Le *bacille typhique* peut également produire des suppurations; ces cas sont extrêmement rares; le siège de ces lésions est généralement dans les os (ostéomyélites, périostites). Plus souvent, il s'agit de suppurations secondaires pro- **Bacille typhique.**

duites par des saprophytes (staphylocoques, streptocoques, bacterium coli).

Le *colibacille* peut également former des suppurations et pulluler dans les organes internes.

Ces deux bacilles seront isolés par les méthodes ordinaires de cultures sur plaques citées plus haut et diagnostiqués d'après les différents caractères que nous indiquerons à propos de la recherche des microbes pathogènes dans les eaux.

CHAPITRE IV

Examen bactériologique des fausses membranes.

I. — *Récolte des exsudats.*

Récolte des exsudats.

Les nombreuses analyses bactériologiques de fausses membranes pratiquées dans ces dernières années, ont démontré que l'exsudat fibrineux qu'on trouve sur le pharynx ou dans le larynx peut être produit par un certain nombre de microbes différents.

Il faut considérer la fausse membrane comme un symptome : l'examen bactériologique seul permet un diagnostic exact.

Les bactéries qu'on rencontre le plus souvent, associées ou non au bacille de la diphtérie, sont : le bacille pseudo-diphtérique, les staphyloco-

ques, les streptocoques, exceptionnellement le pneumocoque et le bacille de Friedländer.

Ces microbes se cultivent facilement et se reconnaissent sur les plaques ensemencées par leurs caractères distinctifs.

La récolte des exsudats à soumettre à l'analyse se fait très simplement au moyen d'un tampon (ouate hydrophile, fragment d'éponge, etc.) qu'on promène sur les parties malades au moyen d'une pince flambée. L'examen direct de l'exsudat en préparations colorées ne donne aucune indication et doit être rejeté.

Nécessité des cultures.

Il faut absolument recourir aux cultures : le tampon est promené à la surface d'une plaque de serum agar (v. plus loin) et cette plaque est déposée à l'étuve pendant douze ou vingt-quatre heures. Dans quelques cas favorables, il est possible de faire un diagnostic en six heures, en appuyant directement le deckglass sur le milieu nutritif (*Klatschpreparaten*), en fixant et en colorant comme d'habitude.

On n'attendra jamais le résultat d'une analyse bactériologique pour pratiquer une injection de serum antidiphtérique : il faut inoculer le serum aussitôt que possible.

Le diagnostic bactériologique sera encore utile pour constater la disparition complète des bacilles pendant la convalescence : il faudra

toujours le pratiquer avant d'autoriser la rentrée à l'école ou au sein de la famille, d'un malade convalescent de diphtérie.

Il faudra également examiner les sécrétions de la gorge des personnes bien portantes qui peuvent avoir été en contact avec des diphtériques et transportent les germes de la maladie.

II. — *Le Bacille de la diphtérie.*

Le bacille de la diphtérie a été isolé et cultivé pour la première fois en 1884 par Löffler.

Examen direct :

Caractères morphologiques.

Bâtonnets immobiles, de dimensions très variables (de 1 à 5 μ de long), présentant une orientation assez typique :

a) Le bacille diphtérique se trouve toujours en amas de dix à vingt éléments, jamais en émulsion homogène dans la préparation;

b) Dans chacun de ces amas, les bacilles sont groupés soit en palissades et en éléments parallèles, soit en V ou à angle droit, mais généralement ils ne se trouvent pas sur le prolongement l'un de l'autre;

c) Enfin, chaque bacille considéré isolément peut se présenter tantôt avec une forme de massue, pointue à une extrémité, renflée à l'autre, tantôt en bâtonnet plus ou moins recourbé et pointu aux deux extrémités.

Le bacille de la diphtérie se colore très facilement par le bleu de méthylène alcalin. (Löffler.)

Il conserve la coloration par le Gram, à condition de ne pas prolonger l'action décolorante de l'alcool absolu.

Caractères biologiques.

Cultures :

A. *En bouillon*. Croissance abondante si le liquide est neutre ou alcalin.

Le bacille diphtérique trouble rarement le bouillon : il pousse en formant une pellicule épaisse à la surface du milieu ; cette pellicule est blanche, écailleuse, très friable et tombe au fond du tube.

B. *Sur gélatine*. Croissance faible, le bacille ne se développant bien qu'à 37°.

C. *Sur agar*. L'agar ordinaire n'est pas un bon milieu pour la diphtérie; il faut y ajouter 6 p. c. de glycérine.

D. *Sur sérum*. Le sérum solidifié est très favorable au développement des colonies de diphtérie. Il se prépare en ajoutant à 3 parties de serum de mouton 1 partie de bouillon peptonisé contenant 1 °/₀ de glucose. Ce milieu est coagulé vers 90°. On maintient les tubes, couchés obliquement, dans une étuve spéciale et on pratique la stérilisation fractionnée, une demi-heure, pendant trois jours consécutifs.

En présence des difficultés de préparation et

à cause de l'opacité de ce milieu qui ne permet pas son emploi en plaques de Petri, nous conseillons d'abandonner le serum de Löffler pour le diagnostic de la diphtérie.

E. *Sérum agar de Joos.* C'est le meilleur milieu pour pratiquer rapidement l'analyse bactériologique des fausses membranes. **Sérum agar.**

Pour préparer le sérum agar on prend :

300 gr. de sérum de cheval;
50 gr. de solution normale de soude;
150 gr. d'eau.

On chauffe à 80° pendant deux heures, pour favoriser la combinaison du serum et de la soude. Ensuite on porte à 100° un quart d'heure.

On ajoute 500 gr. de bouillon peptonisé, 20 gr. d'agar. On chauffe, on filtre et on stérilise. Il ne reste plus qu'à répartir en plaques de Petri.

Avantages du sérum agar : Le bacille de la diphtérie pousse aussi abondamment que sur le serum de Löffler; le streptocoque ne se développe pas et le staphylocoque pousse mal; les colonies de diphtérie se reconnaissent donc très facilement et il est possible de pratiquer l'examen au bout de six heures de séjour à l'étuve.

Toxine diphtérique : Le bacille de Löffler a

la propriété de sécréter une toxine très active dans les milieux de culture. (Roux-Yersin.) Dans l'organisme humain, la résorption de cette toxine est le point de départ des symptomes les plus graves de la maladie, le bacille restant localisé dans les fausses membranes et ne pénétrant que tout à fait exceptionnellement dans les organes.

Les toxines actives sont mortelles pour les cobayes à la dose de quelques milligrammes — Les animaux succombent avec les symptomes caractéristiques.

Pseudo-diphtérie.

Bacille pseudo-diphtérique : Hoffmann a décrit en 1887 un bacille morphologiquement identique à la diphtérie mais qui ne présente aucun caractère pathogène ni pour l'homme ni pour les animaux.

Il se présente assez fréquemment dans les exsudats pseudo-membraneux, même associé au bacille de Löffler. On a beaucoup exagéré l'importance de ce bacille, dont les caractères principaux sont :

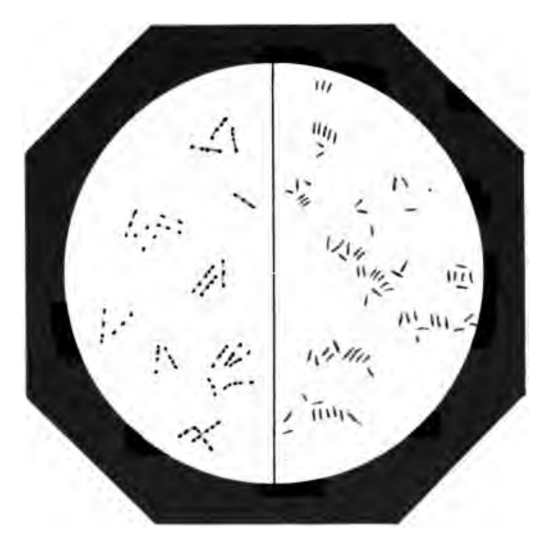
1° Bacille à orientation surtout *parallèle* (en palissades), généralement plus court que le bacille de Löffler (2 à 4 μ de long);

2° Ne donne pas d'acides dans le bouillon (réaction contrôlée au tournesol) ;

3° Pousse fréquemment en amas muqueux,



BACILLES DE LA DIPHTÉRIE (CULTURE PURE)



BACILLES DE LA DIPHTÉRIE (PÔLES EN BLEU) ET DE LA PSEUDO-DIPHTÉRIE (MÉTHODE DE NEISSER)

formant un voile à la surface du bouillon ou nageant dans le liquide sans le troubler (aspect de crachat en émulsion). On observe quelquefois une croissance en pellicule ou bien la production d'un trouble abondant dans le bouillon (surtout pour la pseudo-diphtérie oculaire);

4° Ce microbe n'est pas pathogène pour les animaux : on peut injecter 4 ou 5 gr. de bouillon sous la peau d'un cobaye, sans observer de symptome grave; on constate tout au plus un petit œdème local. Le sérum antidiphtérique n'empêche pas la production de cet œdème alors qu'il arrête absolument la croissance du bacille diphtérique;

5° Le bacille de la pseudo-diphtérie ne se colore pas par la méthode de Neisser, tandis que le bacille diphtérique a des pôles colorés en bleu foncé.

Cette méthode nécessite l'emploi d'une culture jeune (de dix-huit heures au maximum) sur sérum solidifié. On colore la préparation par le bleu de méthylène acétique (à froid) :

Solution aqueuse de bleu de méthylène à 1 p. m. 100 gr.
Acide acétique glacial, 5 gr.

On lave à l'eau et on recolore par une solution diluée de vésuvine (à froid également). Si le

bacille est coloré en brun pâle avec des granulations bleues, très foncées, on considère ce bacille comme de la diphtérie vraie, tandis que le bacille pseudo-diphtérique est coloré très uniformément en brun sans granulations.

Bacille de Weeks.

On rencontre dans les exsudats de la conjonctive un bacille décrit par Weeks. Ce sont des bâtonnets très fins, en chaînettes, se décolorant par le Gram.

Ce bacille se cultive sur serum agar.

On le considère comme l'agent étiologique de la conjonctivite aiguë.

Caractères pathogènes.

Inoculations :

Injecté au cobaye, le bacille de la diphtérie produit des lésions assez typiques : on constate à l'autopsie un œdème local abondant avec exsudat hémorragique. Les capsules surrénales, qui sont normalement jaune clair avec un intérieur brunâtre, sont rouge foncé avec une pulpe hémorragique. Les plèvres et le péricarde contiennent un exsudat séreux plus ou moins abondant.

La virulence des cultures de diphtérie est très variable : on augmente facilement cette propriété par une série de passages en recueillant les bacilles à l'autopsie, dans l'œdème local et en réinoculant la nouvelle culture, mais à dose moindre, à un cobaye neuf; en partant d'une

culture en bouillon tuant un cobaye en quarante-huit heures à la dose de 10 centigr., on arrive facilement après quelques passages à obtenir une culture dont la dose mortelle ne dépasse pas 1 milligramme.

Chez l'homme, le bacille diphtérique produit une infection locale et une intoxication générale. La fausse membrane qu'il produit consiste en un exsudat fibrineux emprisonnant des leucocytes et des bactéries; elle est de consistance variable, tantôt mince et opaline, tantôt épaisse, ferme et blanche. En dessous d'elle, la muqueuse est rouge et saigne facilement. La localisation pharyngée de la fausse membrane constitue plutôt la diphtérie, alors que sa localisation dans le larynx produit le véritable croup.

A côté de cette action locale, le bacille diphtérique peut amener une intoxication générale par diffusion de ses toxines.

On voit certaines diphtéries graves évoluer sans fausse membrane, l'intoxication seule se manifeste alors.

Le bacille se trouve parfois dans la bouche de personnes saines, dans un état de virulence latente. Il possède une grande vitalité et se conserve desséché, pendant plus d'un an, dans les poussières des appartements. Ce bacille n'a *aucun* rapport avec les microbes de la diphtérie aviaire.

Immunité. *Immunité contre la diphtérie* : Certains animaux possèdent une immunité naturelle vis-à-vis de la diphtérie et de ses toxines (souris, rats).

L'immunité active se confère à la chèvre, à la vache et au cheval par l'inoculation sous cutanée de doses progressivement croissantes de toxine. Après quelques mois, le sang de ces animaux renferme l'antitoxine, le contrepoison spécifique de la maladie.

L'immunité passive est conférée par l'inoculation sous-cutanée d'un sérum antitoxique, c'est-à-dire d'un sérum pris à un animal ayant subi l'immunisation active.

Cette immunité passive peut être employée dans un but préventif (inoculation prophylactique). La préservation se prolonge pendant six semaines et s'établit immédiatement. Le sérum est également employé dans un but thérapeutique et son emploi constitue le traitement spécifique de la diphtérie. (Voir les détails aux résultats pratiques de l'immunité.)

CHAPITRE V

Examen bactériologique des crachats.

I. — *Récolte et examen des crachats.*

L'examen bactériologique des crachats se pratique le plus généralement par l'analyse microscopique des préparations colorées. Il faut étaler les crachats sur une plaque de verre ou dans une plaque de Petri et les « couper » véritablement avec deux scalpels ou deux aiguilles montées, de façon à obtenir la partie centrale du crachat qui seule servira pour l'examen.

On en étale une petite parcelle sur un deck-glass au moyen de l'aiguille de platine (éviter d'écraser le liquide entre deux lamelles comme cela se fait trop souvent), on laisse sécher, on fixe rapidement à travers la flamme et on colore

à chaud. Il faut choisir de préférence l'expectoration du matin (surtout pour la tuberculose au début).

La bacille de Koch se reconnaît facilement grâce à la méthode d'Ehrlich, modifiée par Ziehl; si les bacilles sont rares, on peut employer une des méthodes de concentration des crachats indiquées plus loin. Pour les affections tuberculeuses débutantes, l'épreuve à la tuberculine, que nous mentionnons plus loin, donne les meilleurs résultats : elle permet de diagnostiquer une tuberculose bien avant que les signes stéthoscopiques aient révélé une altération quelconque du poumon.

Pour la recherche du pneumocoque, la coloration par la méthode de Gram suffit presque toujours. En cas de doute, il faut inoculer une parcelle de crachat, lavée et diluée dans du bouillon, sous la peau d'une souris : l'animal succombe en vingt-quatre heures, si l'exsudat contient des pneumocoques et on retrouve ceux-ci dans le sang du cœur. Le bacille de l'influenza et les streptocoques se reconnaissent facilement à l'examen direct; l'isolement du bacille de Pfeiffer et sa culture pure s'obtiennent par émulsion du crachat dans l'eau stérile et ensemencement sur les milieux spéciaux.

II. — *Le Bacille de la tuberculose.*

Les travaux de Villemin (1868) ont mis en évidence la contagiosité du tubercule, dont l'agent étiologique, le bacille tuberculeux, a été découvert en 1882 par Koch.

Examen direct :

Caractères morphologiques.

Bacille mince, allongé, mesurant 2-4 μ de long sur 0.2 à 0.3 μ de large. Assez polymorphe. Il se retrouve facilement dans les produits suspects, grâce à une méthode spéciale de coloration découverte par Ehrlich ; une fois vivement coloré, il conserve sa coloration et résiste à l'action de décolorants assez énergiques. Le bacille de la lèpre a la même propriété.

La méthode de coloration la plus simple est la méthode d'Ehrlich, modifiée par *Ziehl-Neelsen* :

1º Coloration à chaud par une solution phéniquée de fuchsine (10 gr. de fuchsine en solution alcoolique saturée mélangés à 90 gr. d'acide phénique à 5 p. c.) ;

2º Décoloration par l'alcool-acide (2 p. c, d'acide nitrique dans l'alcool absolu) ;

3º Lavage à l'eau ;

4º Double coloration au bleu de méthylène en solution aqueuse concentrée ;

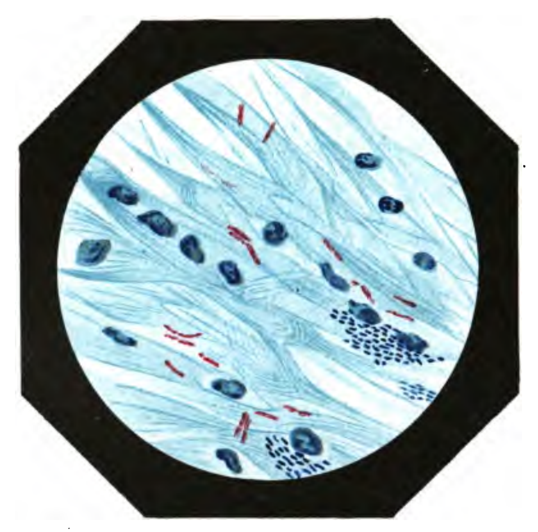
5° Laver à l'eau et monter au baume après avoir séché *soigneusement*.

Dans ces préparations, les bacilles apparaissent en rouge vif sur un fond bleu.

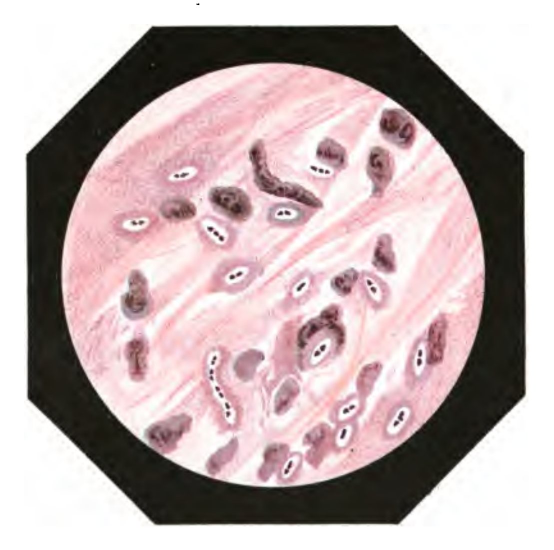
Le bacille de Koch doit cette propriété de retenir les substances colorantes à une matière grasse qu'on a réussi à extraire des cultures, mais qui a été peu étudiée jusqu'ici.

Notons que ce procédé de coloration est parfait pour la recherche de la tuberculose dans les crachats; il ne convient pas pour constater la présence du bacille de Koch dans le *lait* ou dans le *beurre*. Les matières alimentaires grasses renferment outre le microbe de la tuberculose des bacilles morphologiquement identiques et qui prennent le Ziehl. Il faut les différencier par les cultures et par l'inoculation aux animaux (examiner les tubercules au microscope). Les bacilles pseudo-tuberculeux isolés dans ces matières alimentaires se cultivent facilement sur les milieux ordinaires. Chez le cobaye, ils peuvent produire des tubercules microscopiquement identiques à ceux que donne le bacille spécifique et on devra les examiner attentivement pour les différencier de la tuberculose typique.

Lorsque l'examen microscopique des crachats au point de vue de la recherche de la tuberculose ne donne pas de résultat positif, on peut



BACILLES DE LA TUBERCULOSE ET DE L'INFLUENZA
(MÉTHODE DE ZIEHL)



PNEUMOCOQUES DANS UN CRACHAT (GRAM)

concentrer les crachats par l'une des méthodes suivantes :

Méthode de Biedert : Ajouter aux crachats le double de leur volume de soude caustique à 2 p c., faire bouillir. Additionner de quatre parties d'eau et faire bouillir jusqu'à ce que la solution soit bien homogène. Laisser déposer pendant quarante-huit heures dans un vase conique.

Il est recommandable d'ajouter une gouttelette d'albumine sur le deckglass pour permettre la fixation du résidu traité par la soude ;

Méthode de Spengler. Faire un mélange à parties égales des crachats et d'eau stérile additionnée de quelques gouttes de soude normale. Ajouter 1/2 gr. de pancréatine. Placer à l'étuve pendant une demi-heure ; ajouter 1 gr. d'acide phénique. Centrifuger. On examine le résidu.

Pour certains liquides pathologiques renfermant très peu de bacilles tuberculeux (exsudat pleural, urine dans la cystite, etc.) il est toujours préférable de recourir à l'inoculation aux cobayes (v. plus loin).

Cultures du bacille de Koch :

On ne parvient pas facilement à isoler ce bacille en culture pure. Le développement des colonies du bacille de la tuberculose nécessitant un séjour de plusieurs semaines à

Méthodes de cultures.

l'étuve, les contaminations accidentelles se produisent très souvent.

L'isolement du bacille s'obtient le plus rapidement par l'inoculation intrapéritonéale au cobaye et ensemencement des milieux de culture avec des fragments des tubercules miliaires recueillis à l'autopsie de l'animal.

Kitasato a préconisé une méthode d'isolement du bacille de Koch dans les crachats, en choisissant une parcelle purulente qui est lavée successivement dans une dizaine d'éprouvettes ou de plaques contenant de l'eau stérile. Cette opération réussit parfois, à condition que les crachats ne renferment pas un trop grand nombre de microbes étrangers.

A. *Culture sur sérum solidifié* (Koch). S'obtient assez facilement en additionnant le serum de 5 à 8 p. c. de glycérine.

Cette méthode a été employée en premier lieu par Koch.

En examinant une colonie du bacille de la tuberculose à 80 diamètres, on constate un aspect spécial « en arabesques », surtout typique dans les préparations colorées faites par impression (Klatschpräparate), en déposant un deckglass à la surface du milieu nutritif.

B. *Culture sur agar glycériné.* A 8 p. c. l'agar glycériné constitue un bon procédé de

culture, mais il faut éviter la dessiccation en entourant le tube d'un capuchon de caoutchouc.

La tuberculose pousse sur ce milieu en donnant, après quinze jours de séjour à l'étuve, un enduit épais, plissé, blanc-jaunâtre et chiffonné dans tous les sens.

C. *Culture en bouillon glycériné.* Pour obtenir une bonne culture, on doit s'efforcer de maintenir le fragment qui sert à l'ensemencement, à la surface du liquide. La croissance du bacille en *surface* est alors très abondante et on obtint en quinze jours une pellicule épaisse, jaunâtre, ne se détachant pas en écailles comme la pellicule de la diphtérie, mais tombant au fond du récipient, en bloc. Le liquide reste clair.

On favorise énormément la croissance du bacille de Koch en milieu liquide, en ajoutant 1-2 p c de nutrose au bouillon peptonisé ordinaire.

Tuberculines. Nous ne connaissons pas la toxine tuberculeuse. Koch a extrait des cultures, au moyen de la glycérine, un corps qu'il a appelé « tuberculine » et auquel il a attribué une valeur curative. Il a été reconnu depuis, que cette tuberculine a une grande importance pour le diagnostic des tuberculoses mais que sa valeur thérapeutique dans la phtisie pulmonaire est nulle.

Ancienne tuberculine.

La préparation de la tuberculine n'offre aucune difficulté ; on prend des cultures de six semaines en bouillon glycériné et on les chauffe à l'autoclave à 110°; on concentre au dixième au bain-marie et on filtre.

Pour contrôler la valeur du produit obtenu, on se sert généralement de la méthode de Dönitz : on inocule dans le péritoine à une série de vingt cobayes (350-400 gr.) 20 centigr. d'une émulsion bien homogène d'une jeune culture de tuberculose ayant séjourné de neuf à onze jours à l'étuve. Vers la troisième semaine, on pratique l'inoculation d'épreuve et on évalue la dose minima de tuberculine capable de tuer le cobaye en vingt-quatre heures. Cette dose est généralement de 25 centigr.

Tuberculine T. R.

Koch a remplacé l'extrait glycériné par la trituration complète des bacilles desséchés dans un mortier d'agate. – On émulsionne dans l'eau distillée. — L'action immunisante de cette préparation a été affirmée par Koch; son action thérapeutique est très discutable.

Tuberculol (Landmann). On prépare ce produit en filtrant le bouillon tuberculeux sur papier. Les bacilles restent sur le filtre et sont extraits à 40° avec un mélange de solution physiologique et de glycérine ; on décante. Le liquide surnageant de même à 50° avec le même

mélange de glycérine et de solution physiologique. On procède ainsi de 10 en 10 degrés jusqu'à 100°. Les produits obtenus sont réunis et évaporés dans le vide à 37°. Une dose de 10 centigr. tue un cobaye.

Le bouillon de culture, concentré à 37°, est additionné de la substance desséchée. On stérilise sur bougie et on ajoute 0.5 p. c. d'acide phénique.

Cette préparation tue les cobayes à la dose de 1 c. c. Elle est donc beaucoup plus active que les produits antérieurement obtenus (la dose mortelle de l'ancienne tuberculine étant de 10-15 c. c.).

Utilisation de la tuberculine :

1° Pour le diagnostic de la tuberculose des bovidés : On dilue la tuberculine au dixième dans une solution d'acide phénique à 5 p. c. (Cette solution ne se conserve pas !) On injecte 3 à 4 c. c. du produit à une vache, vers le soir ; le lendemain, on prend la température de l'animal toutes les deux heures. Si on constate une réaction fébrile dépassant de 1°,4 la température normale, l'animal doit être considéré comme malade;

2° Pour le diagnostic précoce de la tuberculose humaine, l'inoculation doit se faire avec une extrême prudence. On doit prendre la température toutes les deux heures, pendant les deux

La tuberculine chez l'homme.

jours qui précèdent l'injection, pour avoir une moyenne normale, variant d'un individu à l'autre. On injecte 1 milligr.; deux jours après 5 milligr. et après quarante-huit heures, encore 10 milligr. Si une réaction fébrile suit l'une des deux premières injections, on répète celles-ci avant d'augmenter la dose. Chez les enfants en dessous de dix ans, il faut commencer par 1/2 milligr.; on passe alors à 1 milligr. puis à 5.

Les injections se pratiquent généralement le soir, entre 6 et 8 heures; la réaction, lorsqu'elle se produit, se constate le mieux vers la douzième heure qui suit l'injection. On considère comme réaction une augmentation de température de 0.5°. En cas de réaction on répète la même injection, car celle-ci est généralement plus accentuée la seconde fois. Il ne faut jamais inoculer de malades ayant une température dépassant 38°. Les injections se pratiquent dans le dos et la tuberculine doit être diluée chaque fois dans 1/2 p. c. d'acide phénique. Chez les malades nerveux et facilement suggestionnables, il est bon d'injecter avant ou après de l'eau stérile pour contrôler la réalité de la réaction.

Caractères pathogènes :

A. Chez les animaux, l'inoculation expérimentale de produits tuberculeux donne presque toujours la maladie. Le cobaye succombe à la

suite de l'inoculation sous-cutanée vers le vingtième jour; l'injection dans la chambre antérieure de l'œil donne une tuberculose de l'iris vers le quinzième jour, affection rapidement suivie d'une infection généralisée. Inoculation de la tuberculose.

On constate parfois, chez les cobayes, une affection spontanée simulant la tuberculose et généralement produite par un bacille ovoïde, mobile, donnant une culture déjà au bout de vingt-quatre heures. Les tubercules du foie et de la rate sont plus grands microscopiquement que dans la tuberculose véritable.

On connaît plusieurs autres bactéries produisant de véritables pseudo-tuberculoses (pseudo-tuberculose zoogléique). Ces bacilles ont des analogies avec le bacille de la morve.

D'après les derniers travaux, il est probable que le bacille de la tuberculose n'appartient pas aux schizomycètes ou bactéries, mais au groupe des streptothrix (morve, actinomycose). La forme bacillaire ne serait qu'une forme intermédiaire du développement cyclique d'une moisissure.

On considère généralement le tubercule comme une réunion de leucocytes affluant vers les endroits où se trouvent les bacilles de Koch pour les englober.

Ces phagocytes se transforment, d'après

Metchnikoff, en cellules épithélioïdes ou en cellules géantes, le tubercule étant composé d'une cellule géante centrale, avec quelques bacilles tuberculeux et de cellules épithélioïdes entourées de cellules lymphoïdes ou globules blancs.

Le rôle des cellules fixes du tissu dans la genèse du tubercule est encore obscur. Les tubercules miliaires constituent l'élément caractéristique de la tuberculose généralisée expérimentale qu'on a le plus l'occasion d'étudier dans les laboratoires.

B. Chez l'homme, le bacille de la tuberculose se localise principalement dans le poumon.

Cette maladie est extrêmement répandue dans notre pays, où la tuberculose pulmonaire fait chaque année plus de seize mille victimes.

La contagion peut s'effectuer par les voies digestives, mais se fait généralement par aspiration de poussières infectieuses (rôle important de la dessiccation des crachats). Il faut noter que l'air expiré par les malades ne renferme pas de microbes pathogènes.

L'association du bacille de Koch avec d'autres bactéries, les streptocoques ou le bacille de l'influenza, présente une grande importance clinique et aggrave le pronostic de la maladie.

Immunité contre la tuberculose. Malgré le grand nombre d'expériences tentées sur ce sujet,

les résultats ont été jusqu'ici fort peu encourageants. On se demande encore actuellement si l'immunité contre la tuberculose existe.

Immunité.

Koch a démontré que l'infection tuberculeuse qu'on greffe sur une tuberculose déjà en évolution est beaucoup moins grave pour l'animal qui a subi une première atteinte de la maladie. On peut expliquer de même, par un certain degré d'immunité, les faits nombreux de guérison spontanée de certaines tuberculoses

Malheureusement, l'immunisation des animaux de laboratoire contre la tuberculose est une opération des plus difficiles : Richet et Héricourt ont prétendu, il y a quelques années, avoir conféré l'immunité à des chiens. Mais ces expériences n'ont pas été confirmées ailleurs.

Les travaux sur l'immunité contre la tuberculose ont eu généralement pour but la préparation d'un sérum actif applicable au traitement de la tuberculose humaine.

Sérothérapie.

Depuis 1896, Maragliano s'est efforcé d'immuniser des chevaux par un mélange de tuberculine concentrée à 100° et de cultures tuberculeuses filtrées sur bougie (proportions de 3 parties de tuberculine pour 1 partie de toxalbumine)

Maragliano a prétendu, il y a trois ans, avoir obtenu un sérum qui empêche la mort des

cobayes intoxiqués avec des doses mortelles de tuberculine. Le sérum exerce une action préventive, injecté six heures avant l'intoxication; une dose plus forte permet à un cobaye tuberculeux de supporter l'inoculation d'une dose mortelle de tuberculine sans accident. Ce serum est inoffensif pour l'homme et les animaux.

La valeur thérapeutique du serum antituberculeux est nulle.

Il faut espérer qu'on arrivera un jour à faire bénéficier les malades des conquêtes de la sérothérapie, mais ce ne sera jamais qu'en s'appuyant rigoureusement sur l'expérimentation. Il est probable que l'immunité existe dans la tuberculose comme dans toutes les maladies infectieuses. On se trouve en réalité en présence de difficultés techniques résultant du peu de résistance des animaux qu'on est forcé de soumettre à un traitement continu pour l'immunisation.

III. — *Le Pneumocoque.*

Le diplocoque de la pneumonie ou pneumocoque a été décrit en 1884 par A. Fränkel.

1° *Caractères morphologiques* :

Examen direct. Microcoques de forme assez variable, généralement allongés, pointus à une extrémité, arrondis à l'autre et se présentant par couples de

deux éléments réunis par leur grosse extrémité. Ils ont une forme en fer de lance (lanceolatus).

Le pneumocoque est généralement entouré d'une capsule transparente.

Il se colore par la méthode de Gram.

Pour la recherche du pneumocoque dans les crachats, c'est la méthode de Gram qui convient le mieux : On colore le fond à l'éosine et les pneumocoques apparaissent en violet foncé sur un fond rose; la capsule reste transparente.

Pour contrôler l'examen microscopique, on peut se servir de l'inoculation aux souris : une parcelle de crachat émulsionnée dans l'eau stérile fait succomber l'animal en vingt-quatre à quarante-huit heures : à l'autopsie, on retrouve le pneumocoque entouré de sa capsule, dans le sang du cœur.

2° *Caractères biologiques* : Cultures.

Le diplocoque de Fränkel se cultive assez facilement sur les milieux ordinaires, mais il perd sa capsule qui ne réapparaît que dans le corps de l'animal.

a) Culture en bouillon : trouble léger et très uniforme, sans dépôt On peut centrifuger le liquide, les bactéries restent néanmoins en émulsion sans se déposer.

Il est avantageux d'ajouter un peu de glucose au bouillon, qui doit être franchement alcalin.

Pour neutraliser les acides au fur et à mesure de leur production, on peut mettre de la craie au fond du tube;

b) La gélatine n'est pas liquifiée, mais la croissante reste médiocre;

c) L'agar glucosé (3 p. c.) ou glycériné (5 p. c) convient bien au développement des colonies qui sont petites, transparentes et claires comme de l'eau.

La virulence des cultures varie beaucoup et pour conserver à une espèce ses caractères pathogènes qui s'affaiblissement rapidement, on est obligé de recourir à de fréquents passages à travers l'organisme du lapin.

La toxine du pneumocoque n'est pas connue. Les bouillons filtrés sur bougie ne sont pas toxiques; le poison est donc intra-cellulaire comme pour le choléra ou la fièvre typhoïde : les corps microbiens seuls sont toxiques.

Inoculations.

3° *Caractères pathogènes* :

Le pneumocoque est très pathogène pour la souris et pour le lapin.

L'inoculation sous-cutanée d'une ou de deux gouttes de culture en bouillon de vingt-quatre heures fait succomber une souris très rapidement : dans le sang de tous les organes, et spécialement dans le cœur, on retrouve très facilement le pneumocoque entouré de sa capsule (qui avait disparu dans la culture).

Les cobayes résistent mieux.

Le pneumocoque est l'agent étiologique de la pneumonie franche, mais il se retrouve encore dans bon nombre d'autres affections, notamment les broncho-pneumonies et les bronchites capillaires, les méningites (13 p. c. des cas), les conjonctivites, certaines arthrites etc. Chez les enfants il produit assez fréquemment des otites.

Lésions et fréquence.

On l'a rencontré dans la bouche de personnes saines, vivant à l'état saprophytique.

Immunité.

L'*Immunité* antipneumococcique a été bien étudiée au point de vue expérimental. L'immunité active est conférée par l'inoculation de cultures vivantes ou mieux de cultures tuées par le chloroforme ou la chaleur. Cette immunité aboutit à la formation d'anticorps spécifiques qui se trouvent répandus en grande quantité dans le sérum des animaux immunisés. Le sérum possède un pouvoir préventif très énergique et protège contre l'infection.

L'action du sérum s'exerce non seulement pour prévenir la maladie, mais encore pour guérir une infection débutante. L'action antitoxique du sérum n'a pas été mise en évidence jusqu'ici.

L'application de ce sérum aux affections pneumococciques chez l'homme est encore prématurée.

IV. — *Le Pneumobacille de Friedlander.*

Le pneumobacille, décrit en 1882 par Friedlander, a été confondu primitivement avec le pneumocoque; on lui a attribué une importance trop grande.

C'est un bacille encapsulé, ne se colorant pas par la méthode de Gram.

Il perd sa capsule dans les milieux de culture. Il pousse abondamment en bouillon peptonisé, en produisant un voile visqueux. Il fait fermenter les sucres et ne coagule pas le lait.

Le pneumobacille liquéfie très légèrement la gélatine et produit, en piqûre dans ce milieu, une strie en forme de clou.

On le rencontre dans certaines lésions pulmonaires et dans quelques affections pseudo-membraneuses simulant la diphtérie. Il est très répandu dans l'air et sur les muqueuses à l'état normal (bouche, gorge, etc.)

Le pneumobacille a des rapports biologiques très étroits avec le bacille de l'ozène et le bacille du rhinosclérome.

V. — *Le Bacille de l'influenza.*

Ce bacille a été décrit pour la première fois par R. Pfeiffer en 1890.

1° *Caractères morphologiques* : Examen direct.

Très petits bacilles mesurant de 0.2 à 0.3 μ de large sur 0.4 à 0.6 μ de long.

Immobiles et toujours réunis en grands amas dans les crachats. Ces amas prennent souvent la forme de traînées plus ou moins longues dans lesquelles les bacilles sont généralement parallèles les uns par rapport aux autres.

On les colore facilement par la fuchsine diluée.

Ces bacilles ne prennent pas le Gram.

2° *Caractères biologiques* : Cultures.

Le bacille de l'influenza ne se cultive pas sur les milieux ordinaires. Il ne se développe que dans les milieux à base d'hémoglobine.

a) *Sang de pigeon* : On étale à la surface d'un tube d'agar peptonisé une petite quantité de sang de pigeon fraîchement recueilli : à cet effet, un aide étale l'aile d'un pigeon vivant sur une table, on enlève quelques plumes à la racine de l'aile, on désinfecte à l'alcool et à l'éther et, après avoir sectionné une des veines qui apparaissent à cet endroit, on recueille le sang qui s'écoule dans un tube à réactif stérile. On ensemence l'agar

aussitôt, avant la coagulation. Les tubes préparés de cette façon se conservent assez longtemps. Les colonies sur sang de pigeon (*Blut-agar*) sont très petites, absolument hyalines et transparentes, de la dimension d'une tête d'épingle ;

b) L'influenza se développe également sur agar préparé avec du sang humain et avec du sang de lapin ;

c) Milieu à l'hémoglobine : On prend un mélangede 1.1 p. c d'hémoglobine et de 21.5 p. c. d'extrait de malt qu'on additionne à parties égales d'agar ordinaire maintenu à 50 degrés; ce milieu donne les mêmes résultats que le blutagar de Pfeiffer (Giœlli) ;

d) Milieu à l'albumine : On additionne d'agar, une émulsion de jaune d'œuf dans du chlorure de sodium à 10 p. c. (Nasstinkoff.) ;

e) Milieu liquide : On obtient de bonnes cultures en additionnant le bouillon peptonisé de 1 p. c de sang de pigeon et en faisant congeler pour dissoudre l'hémoglobine.

3° *Caractères pathogènes* :

Les animaux sont réfractaires à l'inoculation du bacille de Pfeiffer : le lapin ne succombe qu'à des injections de doses massives de cultures.

Chez l'homme, outre la grippe et ses diverses localisations, le bacille de l'influenza peut produire des pneumonies caractéristiques

En clinique on abuse fréquemment du diagnostic influenza :

Il est regrettable qu'on ne pratique pas plus souvent l'examen des crachats pour contrôler le diagnostic clinique, surtout que la recherche du bacille de Pfeiffer est extrêmement facile. On peut contrôler l'examen microscopique direct, par les cultures sur blutagar qui s'obtiennent très aisément.

CHAPITRE VI

Examen bactériologique des déjections.

I. — *Analyse des selles en général.*

La technique de l'examen des déjections n'offre aucune difficulté particulière. Règle générale, il faudra soumettre à l'analyse bactériologique tous les cas de diarrhée cholériforme : à cet effet, on recueille quelques centimètres cubes de matières suspectes dans un flacon bien bouché (stérilisation superflue).

L'examen direct permettra de constater la présence du bacille spécifique du choléra; on complétera ce diagnostic par les cultures en isolant le bacille dans l'eau peptonisée et en pratiquant les réactions indiquées plus loin : il faut noter cependant que le vibrion du choléra

est le seul vibrion qu'on rencontre dans l'intestin humain et que la présence d'un bacille courbe dans les déjections indique déjà la probabilité d'un cas de choléra. Les eaux alimentaires au contraire renferment un grand nombre de vibrions non spécifiques et rendent nécessaires des analyses répétées et des examens approfondis pour la recherche de ce microbe.

On rencontre encore dans les matières fécales, des streptocoques dont la présence est facile à démontrer.

Le bacille typhique se retrouve rarement dans les déjections; malgré le grand nombre de méthodes proposées pour son isolement dans les matières fécales, la constatation de sa présence reste une opération fort difficile et peu sûre.

Le bacille de la diarrhée verte se démontre très facilement comme nous le verrons plus loin.

II. — *Le Vibrion du choléra.*

Le vibrion du choléra a été isolé et cultivé en 1883 par R. Koch.

1° *Caractères morphologiques* :

Le vibrion cholérique, appelé encore bacille virgule à cause de sa forme recourbée, n'est pas un bacille mais une spirille, forme allongée, dix ou vingt fois plus longue que les bactéries que

nous avons étudiées jusqu'ici. Ces vibrions se présentent le plus souvent sous forme de fragment de spirilles, en bâtonnets recourbés, mesurant 2 à 3 μ de long sur 0.5 μ de large. La courbure varie beaucoup et peut être fort peu prononcée Ils présentent des formes d'involution très nombreuses.

Ces bactéries sont mobiles et présentent un cil terminal.

Le bacille du choléra se colore facilement par les méthodes ordinaires, notamment par la fuchsine diluée. Il ne reste pas coloré par la méthode de Gram.

Cultures.

2° *Caractères biologiques* :

Le bacille virgule pousse facilement sur les milieux ordinaires : il est très aérobie.

A. Dans le bouillon, il se développe en troublant fortement le liquide.

B. Sur la gélatine, il donne en vingt-quatre heures des colonies petites, blanchâtres et transparentes (caractère important). A un faible grossissement, ces colonies sont granuleuses. Dès le troisième jour, la liquéfaction de la gélatine commence et il reste une espèce de petit noyau nageant dans la gélatine liquéfiée.

En piqûre, dans la gélatine, le choléra liquéfie lentement le milieu en formant une dépression centrale en forme de tête de clou. La

liquéfaction n'atteint les parois du tube que vers le sixième ou septième jour.

C. Sur agar, la croissance est facile et rapide. Il se forme un enduit blanchâtre, humide, plus ou moins abondant.

Indol.

Réaction de l'indol (cholera-roth) : La réaction de l'indol se démontre facilement dans les cultures en bouillon, en y ajoutant quelques gouttes d'acide sulfurique.

Le bacille du choléra ayant un pouvoir réducteur énergique, transforme les matières albuminoïdes en un composé aromatique : l'indol ; les nitrates du bouillon sont réduits en nitrites : l'acide sulfurique sert à mettre l'acide azoteux en liberté et il se produit une coloration rose indiquant la présence de nitroso-indol. Cette réaction s'obtient surtout en milieu peptonisé (bouillon ordinaire, eau de peptone). Elle se produit presque instantanément : la coloration, rose au début, fonce vers le violet au bout d'une heure et passe au brun foncé après vingt-quatre heures.

Toxine.

La *toxine* sécrétée par le vibrion de Koch est peu connue : elle existe certainement, la plupart des symptômes du choléra asiatique étant en réalité des symptômes d'intoxication On pense que la toxine est intra-cellulaire, contenue dans le corps même du vibrion et mise en liberté lors

de sa destruction (Pfeiffer.) Cultivé en sacs de collodion dans le péritoine des cobayes, le vibrion peut sécréter une toxine amenant des symptômes assez graves d'intoxication (Metchnikoff).

Caractères pathogènes :

Inoculation du choléra.

Chez les animaux, le bacille du choléra produit des intoxications rapidement mortelles. Koch a réalisé chez le cobaye l'infection intrastomacale en introduisant une culture de choléra dans l'estomac au moyen d'une sonde, après avoir neutralisé le suc gastrique par du carbonate de soude. Il est utile d'immobiliser en même temps les intestins par une injection de 1 c. c. de teinture d'opium faite directement dans le péritoine.

Cette infection intra-intestinale s'obtient mieux chez les très jeunes lapins : on évite de cette façon la pullulation des bactéries secondaires, très rares chez ces petits animaux. A l'autopsie, on constate une hyperémie de l'intestin (*teinte horsensia*).

L'injection intra-péritonéale produit rapidement la mort : les symptômes sont ceux de la péritonite infectieuse; la mort survient dans l'hypothermie ; les bacilles ne pullulent pas dans les organes.

Immunité.

L'immunité contre le choléra a été beaucoup

étudiée au point de vue expérimental. C'est à la suite de recherches sur le vibrion de Koch que le problème de l'immunité est entré dans une phase véritablement pratique. Les animaux peuvent être immunisés par l'inoculation de doses progressivement croissantes de cultures vivantes ou de cultures tuées par le chloroforme ou la chaleur. L'immunité obtenue est une immunité bactéricide, non antitoxique. Les anticorps spécifiques sont répandus dans le sang des animaux immunisés.

Vaccination. Les microbes vivants du choléra peuvent être inoculés sans danger à l'homme, sous la peau. Il s'ensuit une réaction locale et un état d'immunité active assez persistant. On a utilisé cette immunisation en temps d'épidémie pour prévenir la maladie. (Voir plus loin les résultats pratiques de l'immunité).

4° *Recherche du choléra* :

A. *Dans les selles*, nous avons vu que la pré sence seule du bacille virgule implique déjà l'existence probable du choléra indien typique. Il suffit de faire une préparation colorée à la fuchsine pour observer la présence des vibrions. On a isolé différentes variétés selon les épidémies où les bacilles ont été recueillis (bacille de Massaouah, bacille de Hambourg, bacille de Courbevoie), mais les différences observées tien-

nent à de légères modifications biologiques dans la vitalité des cultures.

Le bacille de *Finkler et Prior* n'a aucune signification spéciale : ce vibrion n'a été trouvé en réalité qu'une fois, en 1884, dans des cas douteux de choléra nostras et se rapproche par la plupart de ses réactions du choléra asiatique. On a beaucoup exagéré son importance.

En piqûre dans la gélatine, il donne un entonnoir plus large, c'est-à-dire une liquéfaction plus rapide que le bacille virgule. C'est un caractère différentiel absolument insuffisant pour en faire une espèce différente, même une variété.

Si l'on rencontre dans les selles un vibrion bien caractérisé, on peut, règle générale, le considérer comme du choléra vrai : il faudra chercher à compléter le diagnostic par la réaction de l'indol, la culture en plaques de gélatine et l'inoculation aux animaux

B. *Dans les eaux*, la recherche du choléra constitue une opération des plus délicates. On a isolé dans les eaux un nombre énorme de vibrions, présentant l'aspect morphologique du choléra, mais en différant par les caractères biologiques et les caractères pathogènes.

Le choléra dans l'eau.

Pour isoler le bacille du choléra dans une eau suspecte, Koch a recommandé la méthode de culture en milieu peptonisé.



VIBRIONS DU CHOLÉRA DANS LES DÉJECTIONS



BACILLES DE LA FIÈVRE TYPHOIDE (COLORATION DES CILS)

On prend 90 gr. de l'eau à analyser et 10 gr. de peptone en solution à 10 p. c.

Ce mélange contient donc 1 p. c. de peptone. On distribue en matras de 20 ou 30 gr. et on dépose à l'étuve. Les vibrions du choléra, très aérobies, viennent pulluler à la surface du liquide en formant une mince pellicule au bout de huit à dix heures. On pourra facilement les isoler, en recueillant un fragment de pellicule au moyen d'une anse de platine et en ensemençant sur plaques d'agar et en tubes de gélatine pour faire des plaques. Quand le vibrion sera obtenu en culture pure, on fera la réaction de l'indol et on pratiquera l'inoculation aux cobayes.

III. — *Le Bacille de la diarrhée verte.*

Il faut souvent pratiquer l'examen bactériologique des selles vertes des enfants afin de pouvoir faire le diagnostic entre la diarrhée verte bacillaire et la diarrhée verte bilieuse. Le bacille de la diarrhée verte (Lesage) est un bâtonnet peu mobile de 2 à 4 μ de long sur 1/2 μ de large, se décolorant par le Gram. Il trouble le bouillon peptonisé en donnant un sédiment verdâtre.

Ce bacille ne liquéfie pas la gélatine et pousse abondamment sur agar. Il donne de petites colonies transparentes et verdâtres.

Il résiste bien à la dessiccation et on pense qu'il peut se transmettre par l'air.

Ses caractères pathogènes ont été peu étudiés jusqu'ici ; chez les enfants du premier âge, il produit les diarrhées vertes infectieuses qu'on ne doit pas confondre avec les diarrhées vertes bilieuses, dans lesquelles le pigment biliaire est d'ailleurs facilement décelable par les réactifs ordinaires.

CHAPITRE VII

Examen bactériologique des eaux.

I. — *Les Analyses d'eau en général.*

1° *Récolte des eaux.* Il est recommandable de recueillir l'eau qui doit être soumise à une analyse bactériologique, dans des flacons stérilisés d'une contenance d'un litre et bouchés à l'émeri. On peut au besoin prendre des bouteilles à vin qu'on fait bouillir remplies d'eau dans une grande marmite ainsi que le bouchon. On vide la bouteille pendant que celle-ci est encore chaude et on la bouche soigneusement.

S'il s'agit d'une eau de distribution, recueillie à un robinet, il faudra laisser couler l'eau pendant cinq à dix minutes avant remplir le flacon.

S'il s'agit d'un réservoir ou d'une large conduite, on plongera le flacon dans l'eau et on l'ouvrira sous l'eau. On opérera de même pour l'eau des citernes.

Si l'on est obligé de prendre l'eau à une pompe, il faudra pomper pendant quelques minutes afin d'éviter de prendre l'eau qui a pu séjourner dans les tuyaux.

Enfin, pour les eaux de puits, spécialement les eaux récoltées à la campagne, il suffira de plonger un seau bien propre dans ce puits et de recueillir l'eau en ouvrant le flacon dans le seau.

2° *Transport des eaux*. L'ensemencement de l'eau dans les milieux de culture peut difficilement se faire sur place. Il faudra donc transporter l'échantillon recueilli aussitôt que possible au laboratoire d'analyse. Il faudra utiliser les caisses spécialement construites dans ce but, renfermant une couche de glace qui permet de maintenir l'eau aux environs de 0°. L'isolement est obtenu par une couche extérieure de son ou de fibre de bois. Ces conditions sont absolument nécessaires pour pouvoir faire une analyse quantitative exacte. Même au point de vue de la recherche des microbes pathogènes il est important d'empêcher la pullulation des bactéries secondaires

qui, par leur nombre, peuvent venir masquer la présence du microbe spécifique de la fièvre typhoïde.

3° *Analyse quantitative* : Analyse quantitative des eaux.

Un examen direct de l'eau à analyser permet de se rendre compte du nombre approximatif des bactéries et de la nécessité d'une dilution plus ou moins forte pour les cultures.

On ensemence l'eau dans les tubes de gélatine maintenus à 37° et on verse en plaques de Petri.

On maintient ces plaques pendant 48 heures à 20°.

On ensemence les plaques avec 1 c.c., 1/2 c c. et 1/4 c. c. d'eau pure. Si l'eau renferme beaucoup de bactéries on peut diluer l'eau au dixième, au centième et au millième.

La numération se pratique en déposant la plaque sur un morceau de papier où l'on a tracé un cercle des dimensions de la plaque avec dix secteurs. Il suffit de numérer les colonies dans un secteur et de multiplier par dix.

Cette méthode est préférable au simple quadrillage, car la répartition de la gélatine dans la plaque est irrégulière ; il y a plus de colonies à la circonférence qu'au centre de la plaque, à cause de l'amincissement central de la couche de gélatine ; il est rare que les boîtes de verre

utilisées soient régulièrement aplaties ; la partie centrale est généralement surélevée.

On peut ensemencer des plaques d'agar en même temps que les plaques de gélatine : il suffit pour cela de laisser tomber à la surface du milieu une goutte de l'eau à analyser, en l'étalant au moyen du fil de platine. On dépose à l'étuve et on numère après vingt-quatre heures.

Règle générale, la gélatine donne de meilleurs résultats que l'agar.

Analyse qualitative des eaux.

Remarquons ici que l'analyse quantitative n'a plus grande importance aujourd'hui : la recherche des microbes pathogènes, spécialement du typhus et du coli, est une opération autrement importante pour apprécier la valeur hygiénique d'une eau alimentaire.

Il faut également faire des réserves au sujet de la signification d'*une* analyse bactériologique pour apprécier la qualité d'une eau de distribution. Cet examen permet évidemment de contrôler la filtration ou même les résultats de la désinfection de l'eau. Mais pour émettre un avis motivé sur une eau de distribution, on ne doit pas perdre de vue que l'origine de l'eau (captation des sources, terrains géologiques qu'elles traversent, etc.) le mode de canalisation, les détails de la distribution sont autant de problèmes hygiéniques de la plus haute importance qui

nécessiteront des recherches longues et minutieuses et qu'on ne pourra pas remplacer par un examen chimique ou bactériologique pratiqué de temps en temps.

Aucun bactériologiste ne devrait consentir à pratiquer l'analyse d'une eau qui n'a pas été recueillie aseptiquement et par *lui-même* ou par une personne expérimentée. En outre, il serait temps qu'on s'entende dans les laboratoires sur l'unification des méthodes d'analyses des eaux, spécialement sur la technique de la recherche des espèces pathogènes qui constitue une opération bactériologique très délicate.

Recherches de bactéries pathogènes :

a) Le choléra doit être recherché d'après la méthode que nous avons étudiée plus haut (voir choléra) ;

b) Le bacille typhique et le bacterium coli nécessitent l'emploi d'une technique tout à fait spéciale et assez compliquée.

On a préconisé un grand nombre de méthodes: la meilleure, est la méthode de Péré.

Méthode de Péré.

On mélange : 150 gr. de bouillon; 830 gr. d'eau à analyser et 20 gr. acide phénique à 5 p. c.

Après agitation on distribue dans dix matras stériles de 100 gr. et on dépose à l'étuve.

Après vingt-quatre heures, on note les matras

qui se sont troublés et on ensemence sur plaque d'agar une goutte des flacons suspects. On peut également repiquer une öse du liquide dans des tubes de bouillon phéniqué à 1 p. c. pendant six heures.

Diagnostic du typhus.

Les bacilles suspects qui poussent alors sont examinés plus exactement. Leur détermination nécessite l'emploi successif des huit méthodes de différenciation citées plus loin.

On pourra considérer comme bacille typhique, un bacille ne prenant pas le Gram, ne liquéfiant pas la gélatine, possédant dix à douze cils, ne coagulant pas le lait, ne faisant pas fermenter les sucres, ne donnant pas d'indol, produisant un enduit blanc nacré sur pomme de terre, poussant dans l'asparagine en donnant une coloration rouge, ne poussant pas sur peptone-mannite et agglutiné par de petites quantités de sérum spécifique.

On pourra considérer comme bacterium coli, un bacille ne prenant pas le Gram, ne liquéfiant pas la gélatine, possédant deux à six cils, coagulant le lait, faisant fermenter les sucres, donnant de l'indol, produisant un enduit brun sur pomme de terre, ne poussant pas dans l'asparagine, donnant une culture dans la peptone-mannite en rougissant le milieu et agglutiné par de petites quantités de coli-sérum obtenu par


CILS DU TYPHUS
CILS DU COLI
LACTOSE
TYPHUS
COLI
LAIT
TYPHUS
COLI
POMME DE TERRE
TYPHUS
COLI
INDOL
TYPHUS
COLI
CAPALDI-PROSKAUER
ASPARAGINE
MANNITE
TYPHUS
COLI
TYPHUS
COLI
AGGLUTINATION
TYPHUS
COLI

l'inoculation de doses croissantes d'un colibacille typique à des cobayes.

Le bacille typhique se retrouve difficilement dans les eaux parce qu'il disparaît rapidement de ce milieu lorsqu'il y est mêlé accidentellement. — Il peut se faire que dans une épidémie de fièvre typhoïde, malgré l'origine hydrique certaine de la maladie, on ne trouve pas le bacille spécifique.

Quant au bacterium coli, il faut distinguer les eaux de puits et les eaux de source : dans les eaux de puits, qui renferment souvent, en grand nombre, des matières organiques, ce bacille très répandu dans la nature, pourra pulluler facilement. — L'analyse chimique aura ici une grande importance, et il ne faudra pas rejeter à priori une eau de puits parce qu'on y aurait rencontré une petite quantité de colibacilles. Cette eau peut être potable. Il suffira de prescrire le nettoyage sérieux du puits.

Dans les eaux de source, au contraire, le bacterium coli, comme le bacille typhique, trouve peu d'éléments favorables à son développement. Le colibacille qui s'y trouve accidentellement doit disparaître bientôt. Aussi, lorsque des analyses répétées auront démontré la présence constante du bacterium coli dans une eau de source,

cette eau devra être considérée *comme impropre à la consommation.* La présence du colibacille indique avec certitude que l'eau est contaminée par des eaux de surface qui y déversent constamment le colibacille. La recherche de l'endroit de la contamination est un problème hygiénique des plus délicats.

Il faut donc élargir singulièrement l'ancienne conception des hygiénistes qui voyaient dans la présence du bacterium coli dans une eau alimentaire la preuve évidente que cette eau était souillée par des matières fécales.

Stérilisation des eaux :

Il n'entre pas dans le cadre de ce manuel d'apprécier les méthodes de stérilisation des eaux alimentaires.

Disons toutefois que les procédés chimiques n'ont donné jusqu'ici aucun résultat satisfaisant dans la pratique. Ils ont été généralement abandonnés.

Le procédé de la filtration sur sable, bien établi et bien surveillé, donne d'excellents résultats (Hambourg).

D'autre part la stérilisation à l'ozone paraît actuellement le meilleur procédé pour obtenir une eau stérile au point de vue bactériologique et potable au point de vue chimique (l'ozone détruisant les matières organiques).

III. — *Le Bacille typhique.*

Le bacille de la fièvre typhoïde a été signalé en 1880 par Eberth dans les organes de malades atteint de fièvre typhoïde. Gaffky a précisé ces recherches en 1884.

Examen direct.

1° *Caractères morphologiques* : Le bacille typhique se présente sous la forme de petits bâtonnets, assez courts, à extrémités arrondies, mesurant 2 à 3 μ de long sur 0,5 à 0,9 μ de large. — Il est très polymorphe : dans les cultures âgées, le bacille s'étend parfois en longs filaments de 15 à 20 μ et plus.

Il se décolore très facilement; il ne faut donc pas trop laver les préparations.

Il ne conserve pas le Gram.

Coloration des cils.

Le bacille d'Eberth est très mobile : il possède 10 à 15 cils qu'on peut mettre en évidence par une des quatre méthodes suivantes : notons d'abord qu'à un point de vue général, il faut employer des deckglass bien propres et dégraissés : on les fait bouillir dans un mélange de : Bichromate de K. 10 p.; acide sulfurique 10 p.; eau 80 p. On lave ensuite à la soude caustique.

Pour mettre en évidence les cils, il faut prendre des cultures jeunes de douze ou dix-huit heures sur agar, émulsionner les bactéries dans de

l'eau distillée et laisser déposer pendant quelques heures : les bactéries les plus mobiles restent à la surface du liquide et, en en prenant une anse, on obtient de très belles préparations.

Technique. A. *Méthode de Löffler :*

a) Mordant (1 minute à chaud) :

> Tannin, 20 p. c., 10 gr. ;
> Sulfate de fer sat. à froid, 5 gr.;
> Sol. alcool. fuchsine, 1 gr.;
> Soude, 1 p. c., 1 gr.

b) Laver abondamment ;
c) Alcool ;
d) Fuchsine anilinée (à chaud) ;
e) Eau ;
f) Monter au baume.

B. *Méthode de Van Ermengem :*

a) Laisser agir une demi-heure à froid :

> Acide osmique à 2 p. c., 5 gr.;
> Tannin à 10 p. c., 10 gr.;
> Acétate de fer, 1 goutte.

b) Laver à l'eau ;
c) Alcool ;
d) Nitrate d'argent 2 p. c. quelques heures ;
e) Mettre sans laver dans :

> Acide gallique, 5 gr.;
> Tannin, 3 gr.;
> Acétate de soude, 10 gr.;
> Eau, 350 gr.

f) Recommencer *d*) et *e*) jusqu'à coloration noire;

g) Laver à l'eau;

h) Monter.

C. *Méthode de Zettnow :*

a) Mordant à l'antimoine :

Solution *A* : tannin, 5 gr.; eau, 100 gr.; chauffer au bain marie à 40°.

Solution *B* : tartre stibié, 1 gr.; eau, 10 gr.; chauffer.

Verser *B* dans *A* jusqu'à ce que le précipité ne se redissolve plus par l'agitation. Filtrer.

Chauffer le mordant sur la préparation cinq à dix minutes à 80°;

b) Laver;

c) Précipiter l'argent sur les bactéries par la solution suivante :

Sulfate d'argent, 4 gr.;

Eau, 500 gr. (sol. saturée); ajouter 50 p. c. d'eau;

Verser goutte à goutte dans une solution d'éthylamine à 30 p. c. jusqu'à ce que le précipité brun noir d'oxyde d'Ag ne se redissolve plus;

d) Laver;

e) Monter.

La préparation du mordant et du colorant offrent certaines difficultés : mais une fois préparés, ils donnent des résultats très satisfaisants.

D. *Méthode simplifiée :*

On obtient d'excellentes préparations en se

servant d'une modification de la méthode précédente :

a) Mordant à l'antimoine (Zettnow), dix minutes à chaud ;

b) Laver à grande eau ;

c) Colorer à la fuchsine phéniquée.

Culture du bacille d'Eberth.

2° *Caractères biologiques* :

Le bacille typhique pousse facilement sur les milieux ordinaires.

En bouillon, il donne des cultures abondantes en vingt-quatre heures ; le liquide est fortement troublé et il se forme à la surface une pellicule irisée qui augmente rapidement d'épaisseur. Après deux jours, on constate la présence d'un dépôt au fond du tube.

Sur gélatine, cultivé en plaques, on constate la présence de petites colonies transparentes, claires, à bord net. Le troisième jour, les colonies prennent des bords irréguliers, irisés, transparents : on les a comparées à une montagne de glace.

Sur agar : La culture est abondante, d'aspect crémeux, blanchâtre.

Le lait fournit des cultures abondantes et n'est pas coagulé.

La *toxine* typhique n'est pas connue ; lorsqu'on filtre les bouillons de culture sur bougie, on constate que le liquide n'est plus toxique

pour les animaux, même à très haute dose. Le poison est donc intra-cellulaire.

3° *Caractères pathogènes* :

Inoculation du bacille typhique.

Les animaux de laboratoire, lapins, cobayes et souris, sont très sensibles à la fièvre typhoïde. On obtient la mort par intoxication. Si les doses injectées ne sont pas trop massives, les bacilles ne se retrouvent pas dans les organes.

On reproduit difficilement les lésions de la fièvre typhoïde chez les animaux.

L'immunité est bien connue : elle s'obtient par l'inoculation de doses croissantes de bouillon traité par le chloroforme ou la chaleur.

Nous avons démontré en 1894 (1) la différenciation du bacille typhique et du bacterium coli par l'immunité : cette méthode est devenue classique aujourd'hui.

Réaction spécifique de Pfeiffer : Les animaux immunisés contre le bacille typhique ont le pouvoir d'agglutiner et de détruire très rapidement les bacilles d'Eberth qu'on leur inocule dans le péritoine. Leur sérum renferme la substance spécifique, et injecté à des animaux neufs il donne à l'organisme le pouvoir de dissoudre les bacilles les plus virulents tandis que le

(1) Étude sur l'immunité contre la fièvre typhoïde. (*Journal de médecine*, décembre 1894.)

sérum normal, inoculé dans les mêmes conditions, n'a pas d'action. De plus, les espèces pseudo-typhiques et le bacterium coli ne sont *pas détruits.*

Il faut suivre la destruction des bactéries sous le microscope en puisant l'exsudat péritonéal au moyen de tubes capillaires et examiner en gouttes pendantes. La dissolution se produit également in vitro.

Quant à l'agglutination, elle peut s'observer à l'œil nu : un mélange de serum spécifique et de bacilles typhiques vrais produit l'agglutination de ceux-ci en grumeaux plus ou moins abondants.

Pour préparer le serum spécifique qui doit servir à la différenciation du bacille typhique et des espèces similaires on injecte dans le péritoine d'une série de cobayes des doses croissantes d'une culture en bouillon tuée par la chaleur. Il faut augmenter les doses prudemment et peser l'animal tous les jours. On n'élève ces doses que lorsque le cobaye a repris à peu près son poids primitif.

Chez l'homme, la porte d'entrée de l'infection est généralement l'intestin, où le bacille produit ses lésions spécifiques De là, les microbes passent dans les ganglions mésentériques et dans la rate, où on les retrouve en très grande quantité.

Les symptômes généraux sont des symptômes d'intoxication.

DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE DE LA FIÈVRE TYPHOÏDE :

1° *Recherche du bacille dans les déjections.* Cette méthode est généralement abandonnée ; malgré le grand nombre de procédés recommandés, aucun jusqu'ici ne permet l'identification certaine et rapide du bacille d'Eberth.

2° *Ponction de la rate.* Cette méthode est assez sûre, mais son emploi n'est pas recommandable à cause du danger de l'opération.

3° *Recherche du bacille dans les taches rosées.* Certains auteurs prétendent avoir retrouvé le bacille neuf fois sur dix dans les taches lenticulaires.

Technique : On lave la peau à l'alcool-éther. On pratique une petite incision à la lancette et on gratte le fond de la tache avec l'instrument avant l'apparition du sang ; on porte la pointe de l'instrument dans du bouillon. Quand la goutte de sang apparaît, on y ajoute une goutte de bouillon et on ensemence sur agar.

Il faut faire porter les recherches sur plusieurs taches.

4° *Serodiagnostic de la fièvre typhoïde.* Le serum des malades atteints de fièvre typhoïde a la propriété d'agglutiner le bacille d'Eberth déjà

au début de la maladie. Cette réaction se produit également avec du sérum normal, mais la dose doit être beaucoup plus forte qu'avec le sérum spécifique. Il faut absolument pratiquer le serodiagnostic en dosant le sérum très exactement, sans quoi la réaction n'a aucune valeur.

Sero-diagnostic.

Technique :

On prend le sang soit au lobule de l'oreille soit à l'extrémité du doigt après lavage à l'éther.

On laisse tomber dix gouttes de sang dans un tube contenant 5 gr. d'eau. On obtient donc une solution de sang au dixième ou de serum au vingtième.

On mélange parties égales de cette solution de serum au vingtième avec une émulsion de bacilles typhiques dans de l'eau stérile. Cette émulsion au quarantième pourra servir de point de départ pour des dilutions plus fortes (quatre-vingtième, cent-soixantième, etc.).

On dépose le mélange à l'étuve et on examine au bout d'une heure.

Cette réaction macroscopique en tube à réactif devra être contrôlée par l'examen microscopique du liquide en goutte pendante. De plus, il ne faut jamais négliger de faire en même temps une préparation de contrôle (tube et porte-objet) avec du sérum normal dilué au vingtième. On examine toutes les demi-heures.

Règle générale, *toute agglutination se produisant au-dessous d'un quarantième est suspecte.*

Le sérum humain normal, de personnes n'ayant jamais eu la fièvre typhoïde, a pu agglutiner à cette dilution.

Si l'on ne dispose que d'une très petite quantité de sang, on pourra pratiquer seulement l'examen microscopique : une goutte de sérum est mélangée à vingt gouttes d'eau et une öse de ce mélange est additionnée d'une öse de culture typhique. Mettre en culture sur porte-objet creusé entouré de vaseline.

IV. — *Le Bacterium coli.*

Le colibacille, hôte normal de l'intestin, a été décrit en 1885 par Escherich.

1° *Caractères morphologiques :*

Bâtonnets souvent peu mobiles, souvent plus courts et plus épais que les bacilles typhiques. Le colibacille possède quatre à six cils, moins nombreux et plus fragiles que ceux du bacille d'Eberth.

Il ne se colore pas par la méthode de Gram.

2° *Caractères biologiques :*

Ce bacille ne liquéfie pas la gélatine. Il donne sur les milieux solides, des colonies

presque identiques à celles du bacille typhique. Sur pomme de terre, il donne un enduit brun. Il coagule le lait et fait fermenter les sucres; il se développe une odeur fétide, fécaloïde dans les bouillons de culture. Les cultures en bouillon donnent la réaction de l'indol avec une goutte de nitrite de K à 1 p. c. et quelques gouttes d'acide sulfurique

Ce bacille est identique au bacillus lactis aerogénès d'Escherich.

3° *Caractères pathogènes :*

Très pathogène pour les animaux de laboratoire, en cultures fraîches. Il produit la péritonite chez le cobaye, avec intoxication mortelle. Sa virulence est assez variable et peut être augmentée facilement par le passage à travers le péritoine.

L'immunisation des petits animaux, des cobayes surtout, est difficile à obtenir : ils succombent facilement au cours de l'immunisation et on doit prendre les plus grandes précautions avant d'élever les doses de culture inoculées.

On dépasse difficilement un tube de culture vivante sur agar, malgré toutes les précautions.

Pour l'homme, le colibacille est un saprophyte qui pullule dans l'intestin. Ce microbe est très répandu dans la nature. Après la mort, il envahit complètement l'organisme.

Le colibacille domine toute la pathologie intestinale : dans certaines circonstances encore peu connues, il peut acquérir une virulence très grande, pulluler dans les organes et amener des symptômes graves d'infection.

L'*immunité* a été étudiée moins complètement que pour la fièvre typhoïde. Quoi qu'en disent certains auteurs, cette immunité est spécifique : contrairement à l'opinion de Demel et Orlandi et de Sanarelli, nous avons démontré dès 1895 que les animaux vaccinés contre le typhus ne le sont pas contre le colibacille et réciproquement. En un mot, l'immunité est spécifique et non réciproque.

Quoique les cobayes supportent assez mal les inoculations progressives de cultures de colibacille pour l'immunisation, il est utile d'avoir du colisérum à sa disposition.

Le sérum étant spécifique rend des services pour identifier le colibacille (analyse des eaux).

Au point de vue pratique, on peut différencier le bacille typhique et le bacterium coli par les caractères suivants, que nous croyons utile de résumer en tableau :

Milieux	Bacille typhique	Bacterium coli
Motilité — Cils.	Très mobiles, douze cils.	Quatre cils.
Culture sur pomme de terre.	Enduit blanc.	Enduit brun.
Milieux lactosés.	Restent bleu au tournesol.	Rougissent au tournesol.
Lait.	Non coagulé.	Coagulé.
Indol	Rien.	Coloration rose.
Lakmus molke (1)	Reste bleu.	Rougit.
Asparagine (Proskauer I) (2).	Ne pousse pas.	Pousse, coloration rouge
Pept. mannite (Proskauer II).	Pousse, coloration rouge	Pousse et n'acidifie pas.
Agglutination par typhus serum.	Spécifique.	Rien.
Agglutination par coliserum.	Rien.	Spécifique.

(1) *Lakmus molke :* On précipite la caséine du lait par l'acide chlorhydrique, on filtre, on neutralise et on ajoute du tournesol.

(2) *Proskauer I :* Asparagine, 0.2 p. c.; mannite, 0.2 p c.; Na cl, 0.02 p. c.; sulfate Mg, 0.01 p. c.; chlorure de Ca, 0,02 p. c.; phosph. monopotass., 0.2 p. c.; tournesol q. s. et neutraliser.

Proskauer II : Peptone, 2 p. c.; mannite, 0.1 p. c.; tournesol q. s. et neutraliser.

CHAPITRE VIII

L'Examen bactériologique de l'air.

I. — *Les Méthodes d'analyses de l'air.*

Les premières expériences sur les microbes de l'air datent des mémorables travaux de Pasteur. On sait que le nombre des bactéries en suspension dans l'air varie considérablement et augmente beaucoup dans les locaux habités.

La plupart des microbes qu'on rencontre dans l'air sont des saprophytes inoffensifs.

Nous connaissons cependant plusieurs maladies infectieuses, la tuberculose notamment, qui se transmettent principalement par l'air.

Les affections exanthématiques (rougeole, scarlatine, variole) dont l'agent étiologique reste inconnu, semblent également se communiquer de cette façon.

Les conditions biologiques dans lesquelles se trouvent les microbes de l'air ne permettent pas la pullulation des espèces peu résistantes à la dessiccation : le choléra et la fièvre typhoïde se transmettent rarement par l'air pour cette raison.

Les streptocoques, les pneumocoques et les bacilles diphtériques qui résistent mieux, se rencontrent plus souvent dans les poussières.

Enfin, les staphylocoques, le bacille de la tuberculose et les bactéries sporulées en général (tetanos, charbon, subtilis) peuvent vivre à l'état desséché pendant des années et trouvent dans l'air un moyen de dissémination très favorable.

Méthodes d'analyse de l'air.

On se sert des méthodes suivantes pour analyser l'air :

A. *Méthode approximative*, consistant à laisser des plaques de gélatine ou d'agar découvertes à l'air libre pendant un certain temps. On détermine les espèces qui se développent après vingt-quatre heures de séjour à l'étuve.

B. *Méthode de Hesse* : on se sert d'un long tube de verre (70 c. de long sur 5 c. de diamètre) dont la paroi interne a été recouverte d'une couche de gélatine. L'air à analyser est aspiré lentement à travers le tube au moyen de siphons gradués. Les microbes de l'air se déposent à la surface de la gélatine et s'y déve-

loppent en colonies (on fait passer 10 litres d'air en vingt minutes généralement).

C. *Méthode de Petri* :

On se sert de petits tubes de verre contenant du sable stérile maintenu en couches minces au moyen d'une toile métallique du diamètre du tube.

Comme aspirateur, on se sert d'une pompe exactement graduée.

D. *Méthode de Bujwid* :

On fait passer l'air à travers des tubes à réactif contenant chacun 2 c. c. d'eau stérile.

On numère les bactéries contenues dans cette eau par les méthodes ordinaires d'analyses des eaux.

E. *Méthode de Würtz* :

On fait barboter l'air dans des récipients contenant de la gélatine liquifiée au bain-marie à 30°.

Analyse des poussières.

Pour analyser au point de vue bactériologique des poussières répandues dans un appartement, il suffit de recueillir ces poussières avec des éponges stériles humectées de bouillon. Le liquide est exprimé et analysé.

Si on recherche spécialement le bacille de la tuberculose, on inocule un fragment d'éponge dans le péritoine d'un cobaye. On observe l'animal pendant trois semaines, puis on le sacrifie

pour constater la présence des tubercules miliaires.

II. — *Les Procédés de désinfection.*

La Destruction des bactéries pathogènes de l'air

On a reconnu que les procédés de désinfection employés jusqu'ici pour détruire les microbes répandus dans les appartements étaient absolument illusoires; les analyses bactériologiques ont démontré l'inefficacité du soufre, de l'acide sulfureux, des nettoyages à la mie de pain, des pulvérisations de sublimé etc.

Nous possédons aujourd'hui dans la formaldéhyde un gaz possédant des propriétés désinfectantes énergiques, un pouvoir de diffusion relativement élevé et n'altérant pas les objets soumis à son action.

On n'est pas d'accord sur les moyens les plus pratiques d'application du gaz ainsi que le démontrent les nombreux appareils préconisés depuis quelques années pour développer l'agent antiseptique dans les locaux contaminés. Il faut en effet éviter la polymérisation de l'aldéhyde qui lui enlève une notable partie de ses qualités désinfectantes.

Nous ne citerons que pour mémoire les lam-

pes formogènes (produisant le gaz par oxydation de l'alcool méthylique), l'appareil Shering (évaporation de pastilles de trioxyméthylène), l'appareil de Rosenberg (évaporation de formaline contenant du menthol), l'appareil Schlossmann (évaporation de formaline glycérinée), etc.

Aucun des appareils précités ne peut détruire complètement et dans un espace de temps restreint les microbes pathogènes résistants; certains de ces appareils coûtent fort cher et sont déjà peu pratiques pour ce motif.

D'après l'ensemble des travaux publiés sur cette question importante, on peut considérer que deux procédés remplissent actuellement les conditions requises pour obtenir une désinfection complète des locaux habités. Ce sont l'autoclave formogène (système Trillat) et l'appareil de Breslau (système Flügge).

A. L'autoclave formogène de Trillat est une simple marmite de Papin qui produit le gaz formaldéhyde sous pression par le chauffage à plusieurs atmosphères d'un liquide appelé formochlorol (mélange de formaline du commerce et de chlorure de calcium). Cet appareil est manœuvré en dehors des appartements, c'est là un avantage très sérieux. Son prix est assez élevé, mais la désinfection obtenue est complète au bout d'une heure. Son emploi nécessite un

personnel stylé : il est recommandable pour les grandes administrations (villes, chemins de fer, etc.)

B. L'appareil de Flügge a l'avantage de pouvoir être manié par la première personne venue. On peut même l'improviser avec une simple casserole et un fort réchaud à alcool. Flügge a démontré que la formaline du commerce (formaldéhyde à 40 p. c. dans l'eau) peut-être évaporée et produire un gaz non polymérisé à condition de la diluer fortement. Pour désinfecter un appartement de 100 mètres cubes par exemple, on prend 800 gr. de formaline mélangés à 3 litres 200 gr. d'eau. On calcule approximativement la quantité d'alcool nécessaire pour évaporer le mélange (800 gr. en moyenne) et on laisse agir les vapeurs pendant sept heures.

Cette méthode exige donc un contact plus prolongé qu'avec l'autoclave formogène. On peut diminuer le temps nécessaire à la désinfection et le réduire à trois heures et demie en doublant la quantité de formaline mise en solution dans l'eau.

Pour neutraliser l'odeur irritante et persistante de la formaldéhyde on peut évaporer dans le même appareil une solution d'ammoniaque à 25 p. c. (800 gr. sont nécessaires pour 100 mètres cubes). Cette méthode a l'avantage d'être très

économique ; Flügge a construit un appareil spécial, mais une casserole de cinq litres suffit parfaitement. Il faut avoir soin d'écarter de l'appareil tout objet pouvant s'enflammer.

Ce procédé très simple est appelé à un grand avenir et remplacera probablement tous les systèmes employés jusqu'ici. Il serait avantageux d'employer le procédé de Flügge hors des appartements en adaptant un couvercle à la casserole avec un long tube passant par le trou de la serrure : on éviterait ainsi les dangers d'incendie en rendant possible la surveillance de l'appareil pendant toute la durée de la désinfection.

Contrôle bactériologique d'une désinfection :

Pour vérifier expérimentalement l'efficacité d'une désinfection, il faut déposer dans les coins de l'appartement des fils de soie ou des carrés de toile imprégnés de cultures microbiennes. Le bacterium coli, les staphylocoques et les spores de subtilis présentent trois échantillons de microbes non pathogènes, donc faciles à manier, et avec des degrés de résistance variables : le coli correspond à une résistance faible (typhus, choléra, etc.) le staphylocoque représente la résistance de la tuberculose et enfin les spores de subtilis ne succombent que très difficilement. En pratique, on peut considérer qu'un procédé qui détruit radicalement *tous* les échantillons de

staphylocoques répandus dans un local contaminé, suffit pour anéantir tous les germes pathogènes.

Le contrôle de la désinfection à la formaline nécessite quelques précautions avant de procéder à la mise en culture des échantillons. Il faut avoir soin de les débarrasser complètement de la formaldéhyde qui peut les imprégner plus ou moins abondamment. Les milieux de cultures solides sont particulièrement à éviter.

On sait qu'un mélange de 2.5 de formaline à 100,000 parties de gélatine ou de 7.5 pour 100,000 d'agar arrête toute croissance microbienne. Il faudra prendre de préférence de très petits échantillons (fils de 1 c. ou carrés de toile de 1 c.) et les plonger dans 10 c. c. de bouillon pour les cultures. De plus, ces tubes devront séjourner à l'étuve pendant plusieurs jours consécutifs, car il arrive souvent qu'une culture reste stérile pendant deux ou trois jours et se développe tout à coup après cette période.

Désinfection des objets (literies, vêtements, etc.). Les étuves à vapeur d'eau donnent de très bons résultats et sont le plus employées actuellement. Les étuves à formaldéhyde ne sont pas encore entrées dans la pratique courante. Un médecin, loin des grands centres, et n'ayant pas d'étuve à sa disposition, pourra improviser un appareil à

désinfection en utilisant une armoire, fermant assez hermétiquement et à travers les parois de laquelle il pulvérisera de la formaline.

Il pourra aussi évaporer une solution diluée de formaline, d'après les proportions du système de Flügge. Après un contact de douze heures, la plupart des microbes répandus dans cette armoire sont tués. Cette installation simple et peu coûteuse pourra rendre des services pour désinfecter des vêtements ou de petits objets contaminés. Pour désodoriser ceux-ci, il suffit de les battre au grand air.

III. — *Les Microbes du sol.*

On a abandonné définitivement l'ancienne théorie de Pettenkofer qui attribuait un rôle important aux eaux du sous-sol dans la propagation des maladies infectieuses. Le sol est en réalité un filtre microbien de premier ordre : la pénétration des microbes des couches superficielles vers les couches profondes et réciproquement est très difficile. Depuis les beaux travaux épidémiologiques de Koch, on a reconnu que le sol ne joue aucun rôle dans la transmission du choléra. On pourrait à la rigueur invoquer une certaine influence du sol pour la conservation ou la transmission des germes de la fièvre

typhoïde; cependant le rôle des eaux alimentaires est bien autrement important ici. La seule maladie vraiment transmissible par le sol est le charbon (épizooties).

Au point de vue hygiénique, il ne peut donc plus être question de la théorie de la maturation des germes. La conservation des bactéries pathogènes peut se réaliser, dans certains circonstances favorables, dans le sol comme dans les autres milieux.

Méthodes d'analyses :

On aura assez rarement à pratiquer des examens bactériologiques du sol. Il faut appliquer ici les mêmes méthodes que celles que nous avons passées en revue pour l'analyse des eaux. Comme les échantillons de terre sont généralement contaminés par un nombre énorme de bactéries secondaires, les cultures directes sur agar ou sur gélatine ne peuvent donner aucun résultat.

Pour recueillir les échantillons à soumettre à l'analyse, il est bon de prendre certaines précautions : si l'on désire récolter de la terre à une certaine profondeur on devra se servir d'un foret spécial (Fränkel) qu'on introduit dans le sol en tournant de gauche à droite. Arrivé à une certaine profondeur, on tourne en sens inverse : il se forme une ouverture à l'extrémité inférieure

de l'instrument qui se remplit alors de terre et dont le contenu servira à l'analyse.

L'analyse doit se pratiquer aussitôt pour éviter la multiplication des bactéries (comme dans l'eau).

L'analyse quantitative n'a pas grande importance, à cause des saprophytes qu'on rencontre surtout dans les couches superficielles.

L'analye qualitative(recherche du typhus, etc.) nécessite l'emploi des méthodes spéciales, indiquées déjà à l'analyse des eaux.

CHAPITRE IX

Examen bactériologique du sang.

I. *Les Bactéries du sang.*

L'examen bactériologique du sang se pratique assez rarement.

Technique. Pour l'examen direct, il suffit de recueillir une gouttelette par piqûre au doigt après désinfection à l'alcool et à l'éther. — Cette goutte peut également servir pour des cultures en ensemençant le milieu avec une anse de platine; mais le sang renfermant très peu de bactéries, il est bon, pour les cultures, d'en prendre au moins 10 à 20 gouttes.

On rencontre fréquemment des streptocoques dans les cas de septicémies et parfois des pneumocoques.

Dans quelques cas de tuberculose miliaire, on a prétendu avoir retrouvé le bacille de Koch.

Des maladies exclusivement septicémiques, comme le charbon, se prêtent naturellement le mieux à l'examen bactériologique du sang.

L'organisme qui présente le plus d'importance au point de vue de l'analyse microscopique du sang est l'agent étiologique de la malaria ou hématozoaire (plasmodium malariae) de Laveran, parasite qui se trouve à l'intérieur ou à la surface des globules rouges et qui se nourrit de la substance même du globule. **Malaria.**

Le développement du parasite de la malaria a été beaucoup étudié dans ces derniers temps et commence a être bien connu : ses transformations successives rappellent le cycle d'évolution des coccidies.

L'hématozoaire de Laveran possède un mode de reproduction tantôt sexué (sporogonie et tantôt asexué (schizogonie) Ces deux phases du développement ont lieu chez un hôte différent : l'évolution asexuelle se produit dans le sang humain (l'homme étant considéré comme un hôte intermédiaire), tandis que l'évolution sexuelle se produit dans le corps du moustique (hôte définitif).

Dans le sang humain, observé à l'état frais, le parasite a une forme amiboïde et se développe

par sporulation (forme dite « marguerite »). Ces spores mises en liberté constituent les mérozoïtes. — Ces mérozoïtes pénètrent dans les globules rouges et recommencent à sporuler ou bien se différencient en individus sexués. Ceux-ci constituent les corps semi-lunaires des fièvres tropicales (gamètes) qui se divisent en formes mâles (microgamétocytes) et en formes femelles (macrogamètes). Chez l'homme, ces éléments sexués ne se développent pas et succombent.

Dans l'estomac des moustiques femelles (hôtes définitifs) qui ont absorbé du sang renfermant les gamètes, on voit les éléments mâles pourvus de cils à chromatine, perdre leurs flagella (filaments-germes). Ces spermatozoïdes deviennent libres et un microgamétocyte s'unit par conjugaison à une macrogamète d'où résulte une zigote mobile (ookinète). Cette zigote pénètre dans la paroi de l'estomac du moustique. Elle s'y développe et s'enkyste. — On constate que le noyau se divise et donne des sporoblastes qui deviendront eux-mêmes des sporozoïtes.

Les sporozoïtes en nombre incalculable passent dans la circulation et se répandent dans tous les organes de l'insecte. Une fois arrivés dans les glandes, ils seront incorporés à l'homme par piqûre, pour recommencer la même évolution.

Schéma de l'évolution.

En résumé, il faut considérer dans la vie de l'hématozoaire, deux phases différentes :

1° *La phase intra-humaine*:

a) Le globule rouge est infecté par un sporozoïte (spore inoculée par piqûre des moustiques) ou par un merozoïte (spore formée dans le sang humain) ;

b) Développement par schizogonie (forme marguerite) et sporulation des merozoïtes (le cycle recommence indéfiniment) ;

c) Développement en forme semi-lunaire ;

2° *La phase extra-humaine* :

a) Le corps semi-lunaire aboutit à la formation d'un élément mâle (avec des spermatozoïdes) et d'un élément femelle ;

b) Copulation : mise en liberté des spermatozoïdes qui pénètrent dans le corps femelle (macrogamète) ;

c) Il en résulte une zigote mobile qui s'enkyste et produit les sporozoïtes.

La transmission de la malaria par les moustiques est un fait bien établi.

Deux théories ont été le point de départ de nos connaissances sur l'évolution de l'hématozoaire :

1° En 1896, Manson avait cru que l'hématozoaire se développait dans l'intestin des moustiques. Quand ceux-ci succombaient, les parasites

étaient mis en liberté dans l'eau ou à la surface du sol. L'homme s'infectait donc, soit en buvant de l'eau contaminée, soit en aspirant des poussières;

2° A la même époque, Bignami a prétendu que les moustiques s'infectaient dans le sol qui renferme le parasite et donnaient la maladie à l'homme par piqûre.

S'appuyant sur ces deux théories ingénieuses, Ross a pu démontrer expérimentalement le développement cyclique du proteosoma, hématozoaire des oiseaux : ses recherches ont été confirmées par les travaux récents de Koch. Ross a trouvé, à côté des filaments-germes, une deuxième variété d'éléments reproducteurs (spores noires) qui représentent peut-être une forme de résistance de l'hématozoaire.

Les quatre affections malariennes à cycle thermique spécial qui sont produites chez l'homme par l'hématozoaire sont :

a) La fièvre quarte;

b) La fièvre tierce;

c) La fièvre tropicale pernicieuse;

d) L'hématurie ou bilieuse hématurique.

L'hématozoaire prend des caractères assez spéciaux dans chacune de ces maladies.

La bilieuse hématurique serait due, d'après Koch, à une intoxication par la quinine.

Les caractères de l'hématozoaire dans les trois premières affections se résument comme suit :

	Quarte	Tierce	Tropicale
Durée de la sporulation . . .	72 heures	48 heures.	--
Mobilité . . .	Faible.	Forte	Très forte.
Pigment . . .	Très gros.	Fin.	Très fin.
Altération des gl. rouges . . .	Minime.	Forte (laitonné).	Tous sont atteints
Nombre de spores	8	16	—
Formes semi-lunaires. . . .	Très rares.	Très rares.	Abondantes

Diagnostic de la malaria :

1° *Préparations non colorées :*

On peut procéder à l'examen immédiat du sang recueilli par piqûre au lobule de l'oreille ou au doigt : l'examen microscopique des préparations fraîches non colorées permet à une personne expérimentée de poser le diagnostic de la malaria.

2° *Préparations colorées :*

Si le diagnostic ne peut pas être fixé immédiatement, on doit recourir aux préparations colorées.

Celles-ci sont fixées d'abord à l'alcool-éther pendant 10 minutes.

On a recommandé un grand nombre de réactifs colorants pour mettre l'hématozoaire en évidence.

Nous nous bornerons à citer ici les deux méthodes principales :

A. ***Méthode de Plehn*** :

Sol. aq. de bleu de méthylène . . .	60 gr.
Sol. alcool. (75°) d'éosine 1/2 p. c. . .	20 gr.
Eau	40 gr.
Potasse à 20 p. c.	12 gouttes.

Colorer pendant 5 min.

Les noyaux sont bleu foncé, l'hématozoaire bleu clair.

B. ***Méthode de Romanowsky***, modifiée par Nocht :

Solution *A*.	2 à 3 gouttes d'éosine à 1 p. c. 2 gr. eau.
Solution *B* (à laisser quelques jours à 60°)	bleu méthylène 1 p. c. dans l'eau. soude 1/2 p. c.

Verser *B* goutte à goutte dans *A* jusqu'à ce que la teinte spéciale de l'éosine disparaisse.

La coloration est obtenue en 5 min. à froid.

Les noyaux sont rouge-violet, le protoplasme des leucocytes et de l'hématozoaire est bleu, la chromatine est rouge vif.

Cette méthode donne actuellement les meilleurs résultats.

C. *Coloration sur porte-objet* (méthode de Ruge) :

On recueille le sang à l'extrémité du doigt en raclant la peau au moyen d'un deckglass pour recouvrir un de ses bords d'une petite quantité de sang.

On étale ce sang sur le porte-objet en y promenant le bord imprégné du deckglass avec une inclinaison de 45°.

On fixe par l'alcool absolu (1/2 heure au maximum).

On colore par le bleu de méthylène (Ruge) préparé comme suit :

100 gr. eau.
0.2 gr. soude : On fait bouillir.
On ajoute 0.3 de bleu de méthylène pur.
48 heures après, on filtre (refiltrer tous les 15 jours).

La coloration des hématozoaires est instantanée.

Ils sont colorés en bleu grisâtre. Les formes annulaires apparaissent en bleu foncé, les globules rouges en vert jaunâtre.

Cette méthode évite la différenciation des hématozoaires par des réactifs tels que l'acide acétique, le methylal (Kossel), qui sont néces-

saires lorsqu'on se sert de solutions colorantes alcalines concentrées. — (Bleu de Manson.)

Elle se recommande surtout pour les examens rapides, loin des laboratoires.

CHAPITRE X

L'Immunité.

I. — *Action des bactéries sur l'organisme.*

Une maladie infectieuse peut être considérée comme une lutte entre deux éléments qu'il faut considérer séparément : le microbe d'une part, l'organisme humain de l'autre. — Chacun de ces éléments dispose de forces variables : les bactéries agissent principalement par leur ***multiplication*** plus ou moins rapide, leur degré de ***virulence*** et leur pouvoir de sécréter des substances ***toxiques***. De plus, des espèces différentes peuvent s'entr'aider, et augmenter ainsi leur pouvoir pathogène (***infections mixtes et associations microbiennes***).

Pour repousser cette attaque, l'organisme

humain dispose à son tour d'un ensemble de moyens de défense qui constituent ce qu'on appelle l'état d'immunité et qui comprend tous les degrés de résistance depuis l'immunité naturelle la plus physiologique jusqu'aux stades les plus avancées de l'immunité acquise spécifique contre les virus ou contre les toxines.

A. *Multiplication des bactéries* : On a divisé, à un point de vue général, les microbes en deux catégories : les saprophytes et les pathogènes.

Les saprophytes sont des bactéries inoffensives qui recouvrent en plus ou moins grand nombre la peau et les muqueuses et qui trouvent là, dans les conditions normales, une barrière difficilement franchissable.

Ces saprophytes sont assez fréquemment accompagnés de microbes pathogènes dans un état de virulence latente : ceux-ci n'attendent qu'un moment propice pour se développer plus abondamment.

Ce fait s'observe fréquemment pour le bacille de Löffler qu'on retrouve dans la bouche de personnes bien portantes, n'ayant jamais eu la diphtérie.

Il en est de même dans l'intestin, où le bacterium coli se retrouve toujours en abondance sans produire de phénomènes morbides ; peut-

être est-il même utile pour la digestion. Dans certaines circonstances encore mal définies, ce bacterium coli peut acquérir un pouvoir pathogène important : il arrive alors à pulluler dans les organes et y secrète des toxines actives.

Il n'y a pas à tirer de ces faits cliniques des arguments contre la spécificité des bactéries. Les espèces microbiennes sont très constantes; un saprophyte n'a jamais pu être transformé expérimentalement en bactérie pathogène : le bacterium coli n'a jamais produit la fièvre typhoïde, comme on l'a soutenu il y a quelques années. De même, un vibrion des eaux, morphologiquement identique au bacille virgule de Koch, n'a jamais donné le choléra indien.

Nous connaissons encore mal le rôle physiologique des saprophytes, mais l'action des microbes pathogènes sur l'organisme a été beaucoup mieux étudiée Les effets de ces bactéries peuvent être très variables : tantôt elles restent localisées en un point déterminé du corps et s'y développent lentement : dans ce cas le bacille est dit toxique, parce qu'il exerce son action au loin par la sécrétion de toxines dangereuses; tantôt, au contraire, les microbes se multiplient rapidement et produisent des septicémies graves par diffusion dans l'organisme tout entier. Outre ces deux types cliniques bien caractérisés, nous connais-

sons encore un certain nombre d'affections intermédiaires où, selon les circonstances variant avec la virulence des bactéries ou avec la résistance de l'organisme, les microbes restent tantôt localisés en un point et tantôt envahissent les organes internes.

Au point de vue anatomique, nous savons que les bactéries exercent leur action nocive en produisant, dans les tissus, tous les degrés de l'inflammation et nous connaissons même plusieurs espèces qui provoquent des lésions plus considérables qu'on réunit sous la dénomination d'inflammations spécifiques. Dans ces circonstances, la transformation des tissus aboutit à une multiplication des cellules fixes accompagnée d'exsudation et même de nécrobiose (granulomes infectieux : tuberculose, lèpre, etc.).

L'action de chaque microbe sur les tissus est spéciale : il doit y avoir là des affinités chimiques délicates mises en jeu, et nous savons, par exemple, que les bacilles tuberculeux tués par la chaleur provoquent, lorsqu'ils sont absorbés dans les tissus, les mêmes lésions que les bacilles vivants. L'action intime des microbes s'exerce en un mot par les substances chimiques qu'ils renferment et par les toxines qu'ils sécrètent.

Virulence.

B. *La virulence des bactéries.* Cette fonction des microbes constitue un élément important de

la pathologie infectieuse et son étude mériterait d'être reprise aujourd'hui. On a opposé depuis longtemps la « virulence » des bactéries et leur « pouvoir toxique », mais nous ignorons encore actuellement les rapports qui peuvent exister entre ces deux propriétés. La virulence n'est qu'un terme assez vague par lequel on désigne le plus généralement l'effet pathogène, sans savoir exactement quelles en sont les conditions. Les microbes pathogènes présentent les degrés de virulence les plus variés et cette virulence est généralement liée à leur développement propre d'une part et à leur pouvoir toxique d'autre part.

On peut constater expérimentalement que le développement d'une bactérie peut être faible et localisé, si la dose de culture inoculée est elle-même minime (streptocoque, pneumocoque) ; l'infection ne pourra devenir mortelle que si la dose injectée est très forte : dans ce cas, on a coutume de dire que la culture est peu virulente. Nous connaissons d'autres bactéries qui se généralisent toujours et agissent sur l'organisme par leur multiplication dans tous les organes (charbon). Ici, le degré de virulence est fort difficile à apprécier.

Cette propriété de virulence se réduit en somme, la plupart du temps, à une question de

sécrétion de toxines plus ou moins actives. On peut augmenter artificiellement la virulence par le passage d'une culture d'un animal sensible sur un autre animal également sensible : le bacille de Löffler peut être amené à un degré de virulence très prononcé par ce moyen. Voici un exemple de cette exaltation de virulence d'une culture de dipthérie, à la suite de cinq passages sur les cobayes :

Exaltation de virulence.

un	cobaye	nº 1	reçoit	0.10	de cult.	✠ en 24 heures
puis	»	nº 2	»	0.05	»	du cob. I ✠ en 24 h.
»	»	nº 3	»	0.01	»	» II : ✠ en 36 h.
»	»	nº 4	»	0.005	»	» III : ✠ en 2 j.
»	»	nº 5	»	0.001	»	» IV : ✠ 9 j.

On obtient donc au cinquième passage, une culture cent fois plus active ou cent fois plus « virulente » que la culture primitive.

Il est probable que la virulence de certaines bactéries augmente également par la présence d'autres espèces microbiennes : le bacille diphtérique, par exemple, secrète plus de toxines si on le cultive en présence de streptocoques, ainsi que l'ont démontré nos expériences publiées en 1894.

Par contre, certaines bactéries peuvent s'opposer au développement d'autres espèces et diminuer leur virulence assez notablement : tel le bacille pyocyanique mis en présence du charbon

ou bien le prodigiosus en présence du charbon symptomatique.

Il semble donc, en résumé, que la virulence soit en rapport avec la vitalité d'un microbe (reproduction plus ou moins rapide) et surtout avec sa fonction toxique (sécrétion de toxines actives).

C. *Les toxines* : La production des toxines constitue la propriété la plus intéressante des bactéries, et celle par laquelle elles exercent le plus généralement leur action. On y rapporte actuellement la plupart des symptômes infectieux. Le phénomène de production des toxines est bien connu au point de vue expérimental, mais son mécanisme intime nous échappe absolument. On parle trop souvent de *toxines* en bactériologie; les toxines du vibrion du choléra, du bacille de la fièvre typhoïde, du bacille de la tuberculose, du pneumocoque, etc., nous sont absolument inconnues et si leur existence ne peut plus être mise en doute au point de vue de la pathogénie des symptômes observés pendant l'infection, aucune expérience n'a réussi jusqu'ici à les mettre en évidence dans les cultures; les bouillons filtrés sur bougie, c'est-à-dire privés de germes, sont absolument inoffensifs. C'est ce fait qui a amené la division artificielle des maladies infectieuses en maladies

Toxines et cultures

toxiques (tétanos, diphtérie) dont on obtient très facilement les toxines in vitro, et en maladies infectieuses proprement dites, où le microbe ne sécrète pas de poisons décelables. Il est probable que nous obtiendrons un jour toutes ces toxines quand les milieux de culture auront été perfectionnés suffisamment pour mettre en évidence ces substances délicates.

L'organisme humain est très sensible aux toxines; celles-ci portent leur action principalement sur le système nerveux et sur le système vaso-moteur. Nous avons déjà constaté que la production toxique est en rapport pour certaines affections, comme la diphtérie, avec la virulence du microbe. Un bacille peu virulent donne une toxine peu active qui tue le cobaye à la dose de 20 centigr.; le même bacille rendu virulent par des passages produit une toxine qui tue à une dose cent fois moindre.

La production toxique intimement liée à la virulence est souvent augmentée encore par les associations microbiennes : dans la diphtérie, par exemple, le streptocoque aide puissamment l'action toxique du microbe.

L'influence des toxines sur l'organisme a été comparée à l'action des diastases, comme l'ont montré Roux et Yersin dans leurs travaux sur la toxine diphtérique.

On suppose qu'en circulant dans l'organisme, la toxine rencontre certaines cellules pour lesquelles elle possède une affinité spéciale, qu'elle se fixe à ces cellules pour y amener des lésions profondes; d'après Ehrlich, les toxines renferment deux substances (groupements atomiques); l'une, la substance *toxophore*, est le véritable principe actif du poison, l'autre, la substance *haptophore*, sert à fixer la substance active ou toxophore sur les éléments sensibles de l'organisme vivant (cellules nerveuses pour le tétanos). Théorie d'Ehrlich.

La substance haptophore fixe également l'antitoxine : elle sert d'intermédiaire entre le poison et le contrepoison, c'est-à-dire, comme nous le verrons plus loin, qu'elle permet à l'antitoxine de neutraliser la toxine, en servant de trait d'union entre ces deux substances.

D. *Les associations microbiennes et les infections mixtes*. On a bien souvent observé en clinique que l'action pathogène d'une bactérie peut être renforcée par l'intervention d'autres espèces, souvent inoffensives par elles-mêmes. Infections mixtes.

Dans les maladies infectieuses, les associations microbiennes sont très fréquentes et on peut considérer l'infection pure comme une exception.

Ainsi, dans les suppurations, il y a presque

toujours deux staphylocoques en jeu, parfois un staphylocoque et un streptocoque.

L'infection diphtérique n'est presque jamais isolée, le bacille de Löffler se présentant toujours associé au staphylocoque ou au streptocoque.

Le microbe associé, qui est généralement un saprophyte, peut prendre dans certains cas une importance plus considérable, et on connaît la gravité des diphtéries septiques où le streptocoque pyogène domine le tableau morbide.

Dans la fièvre typhoïde, on observe parfois des suppurations dues aux staphylocoques ou aux streptocoques : ces microbes profitent de l'affaiblissement du terrain produit par la maladie primitive pour se développer abondamment et envahir l'organisme.

Dans la tuberculose, on voit fréquemment le streptocoque ou le bacille de l'influenza venir se mêler aux lésions tuberculeuses et aggraver le pronostic de la maladie.

On pense qu'il y a plus qu'une superposition de deux infections et qu'on se trouve en présence d'une action réciproque d'une espèce vis-à-vis d'une autre, avec augmentation de virulence ou de toxicité.

Les vérifications expérimentales de ces faits cliniques sont encore peu nombreuses : pour

étudier l'action de deux bactéries il faut éviter de produire une double infection : on connaît les expériences classiques de Roux et Yersin sur l'infection mixte dans la diphtérie et celles de Vincent sur les associations microbiennes de la fièvre typhoïde.

Reprenant cette question, nous avons pensé qu'il était utile de neutraliser les effets d'une des bactéries par un sérum spécifique exactement dosé et nous avons publié en 1894 une série d'expériences sur l'infection mixte dans la diphtérie, en neutralisant les effets du bacille de Löffler par le sérum antidiphtérique : on peut constater alors d'une façon indiscutable que les streptocoques augmentent réellement la sécrétion toxique des bacilles diphtériques

Ces expériences ont été confirmées par plusieurs expérimentateurs qui ont réussi depuis lors à démontrer que le bacille diphtérique mis en culture avec des streptocoques sécrète plus de toxines que lorsqu'il est cultivé seul (Hilbert). C'est donc la démonstration *in vitro* du phénomène que nous avons mis en évidence dans l'organisme du cobaye.

Ces faits expérimentaux nous permettent d'entrevoir toute l'importance de l'infection mixte et des associations microbiennes dans le cours d'une maladie infectieuse.

II. — *Action de l'organisme sur les bacilles. La résistance naturelle.*

Nous avons passé en revue les forces dont disposent les bactéries pour attaquer l'organisme humain dans la lutte que représentent les maladies infectieuses. Considérons maintenant les éléments de défense qui sont mis à notre disposition pour empêcher la multiplication et l'invasion des bactéries pathogènes.

Immunité naturelle.

On comprend tous ces phénomènes sous la dénomination générale d'***immunité***, depuis le degré le plus simple de la résistance naturelle de l'organisme jusqu'à l'état réfractaire le plus absolu.

L'étude de l'immunité aboutit à opposer l'action réciproque des substances bactéricides et de la phagocytose.

Au point de vue de la pathologie infectieuse, un organisme envahi par des bactéries dispose de deux éléments importants de résistance : la réaction cellulaire ou phagocytose et l'action microbicide des humeurs, spécialement du sérum sanguin.

Chacun de ces phénomènes exalté au cours de l'immunisation a pu être considéré il y a quelques années comme étant la cause principale de l'immunité ; l'école allemande soutenait

la théorie humorale, attribuant le rôle important à l'état bactéricide des liquides organiques et niant l'influence de la phagocytose tandis que l'école française, s'appuyant sur les travaux mémorables de Metchnikoff, mettait en évidence l'action primordiale des globules blancs dans la défense contre les infections.

Examinons brièvement ces deux phénomènes intéressants, la phagocytose d'une part, l'état bactéricide du sérum d'autre part.

A. *Phagocytose :* Phagocytose.

Metchnikoff a prouvé par des expériences très précises, que la phagocytose ou réaction cellulaire vis-à-vis des corps étrangers et spécialement des bactéries, se retrouve dans l'échelle animale tout entière.

Très combattue au début, la théorie de Metchnikoff est généralement admise aujourd'hui.

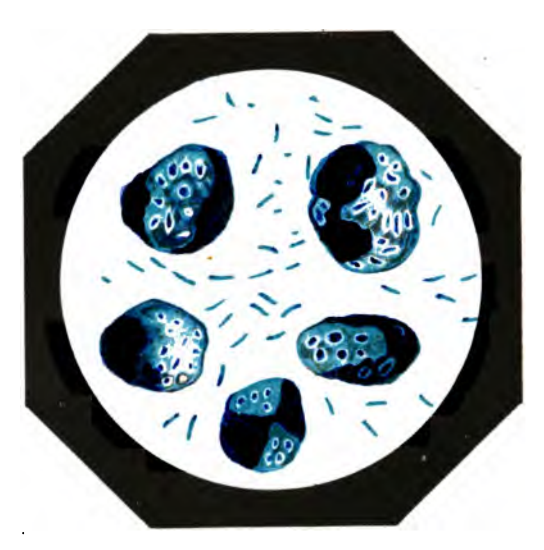
On a pu constater dans des expériences précises, que les leucocytes sont attirés par les sécrétions microbiennes et qu'ils digèrent les bactéries après les avoir englobées. Ce phénomène est mis en évidence d'une facon très simple : il suffit d'inoculer dans le péritoine d'un cobaye une dose non mortelle de culture virulente. L'exsudat est prélevé de dix en dix minutes au moyen d'une pipette en verre effilé et observé sous le microscope en goutte pendante. On

Démonstration de la phagocytose.

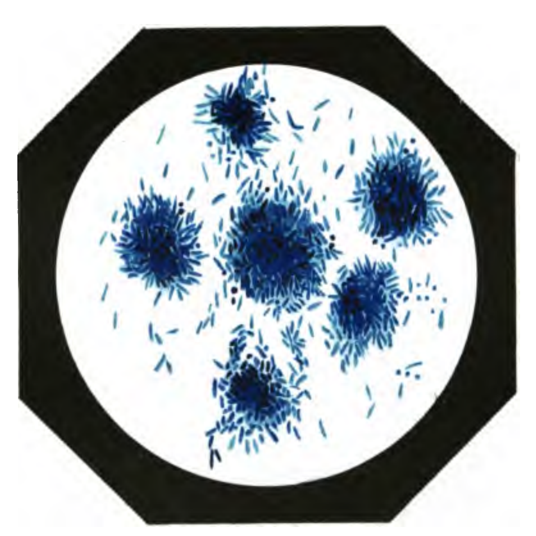
constate facilement que lorsque les microbes ont été englobés ils ne tardent pas à perdre leur forme et à se transformer en granules.

Une deuxième expérience classique consiste à comparer l'effet de l'injection d'une dose *mortelle* de culture chez un animal neuf et chez un animal immunisé au moyen d'une inoculation préventive de sérum spécifique. Dans ce cas, on peut observer que le péritoine de l'animal immunisé renferme beaucoup moins de bactéries que l'autre : les bacilles contenus dans les phagocytes de l'animal immunisé sont déformés et se colorent mal, alors que les globules blancs du cobaye normal paraissent bourrés de microbes qu'on peut colorer complètement et qui sont intacts pour la plupart. En continuant l'observation, on voit ces globules blancs détruits par la multiplication des bactéries qui pullulent bientôt en abondance dans le liquide péritonéal. Chez l'animal immunisé au contraire, les phagocytes ne tardent pas à être vainqueurs dans la lutte et font disparaître toute trace de bactérie vivante. Nous verrons plus loin que les globules blancs sont aidés dans cette œuvre d'extermination par les substances spécifiques introduites dans l'organisme du cobaye par l'immunisation.

A côté de la destruction intra-cellulaire, nous pourrons constater l'importance de la destruc-



PHAGOCYTOSE (DESTRUCTION INTRA-CELLULAIRE DES BACTÉRIES)



AGGLUTINATION ET PHÉNOMÈNE DE PFEIFFER
(DESTRUCTION EXTRA-CELLULAIRE)

tion extra-cellulaire, s'exerçant en dehors de la présence des phagocytes; si un animal neuf a reçu une dose mortelle de culture, il y a donc paralysie de la phagocytose et pullulation des microbes jusqu'à la mort.

On considère généralement deux espèces de phagocytes :

a) Les phagocytes *mobiles* ou microphages constitués par les globules blancs à noyaux multiples ou lobés (grands mononucléaires, polynucléaires neutrophiles);

b) Les phagocytes *fixes* ou macrophages n'émigrant pas, composés des cellules de la rate, du tissu conjonctif, de l'épithelium pulmonaire, etc.

Le phénomène de réaction cellulaire qui constitue la phagocytose peut se décomposer en plusieurs phases ; il y a d'abord une attraction entre les leucocytes et les bactéries (chimiotaxisme positif), ensuite une diapédèse des leucocytes hors des vaisseaux, en troisième lieu l'engloblement des bactéries par les phagocytes et enfin la déformation et la digestion des microbes se terminant par leur disparition complète.

Chacun de ces phénomènes a été bien étudié et il n'entre pas dans le cadre de ce résumé d'en approndir les détails.

B. *État bactéricide des humeurs* :

Von Fodor a constaté le premier que les bacilles du charbon sont détruits *in vitro* dans du sang de lapin. Le pouvoir microbicide du sang a été confirmé ensuite par les expériences de Nuttall (1888).

Buchner a démontré vers la même époque, que le sérum jouit des mêmes propriétés antiseptiques que le sang complet.

Enfin Behring et Nissen ne tardèrent pas à mettre en évidence ce fait important qu'un sérum donné n'est pas bactéricide pour toutes les espèces microbiennes et que la destruction des bactéries subit de grandes variations d'après l'espèce animale qui a fourni le sérum et d'après le microbe envisagé.

Après ces travaux classiques, Buchner démontra l'existence dans le sérum normal de substances bactéricides actives auxquelles il a donné le nom d'alexines; ces alexines qui se trouvent aussi bien dans le sérum spécifique que dans le sérum normal, ont acquis récemment une importance très grande et leur rôle dans l'immunité est devenu primordial, ainsi que nous le verrons plus loin.

Alexines. Buchner a démontré que ces corps bactéricides sont très instables et qu'ils sont détruits sous l'influence d'une température de 55° à

60° prolongée pendant une demi-heure. Les alexines diminuent assez rapidement dans un sérum laissé à 37° pendant quelques jours et on a pu constater qu'elles se détruisent progressivement par le repos prolongé. Le sulfate de soude à 40 p. c. les précipite.

L'origine des alexines du sérum est obscure. Buchner les considère comme provenant directement des globules blancs. Leur origine.

En effet, l'état bactéricide du sérum augmente sensiblement avec la leucocytose; de plus, les exsudats leucocytaires sont plus microbicides que le sérum; on a vu encore que le sérum normal est plus bactéricide que le sérum obtenu pendant la période d'hypoleucocytose : tous ces faits plaident en faveur de l'origine leucocytaire des alexines. Mais il faut avouer qu'on a beaucoup exagéré le rôle des sécrétions leucocytaires (alexocytes) et toutes les expériences tentées jusqu'ici pour isoler ces subtances des globules blancs, ont échoué. (Schattenfroh, Jakob, Bail.)

Metchnikoff a démontré que les alexines ne sont mises en liberté que par la mort des leucocytes et qu'il ne peut s'agir de sécrétions leucocytaires. Bordet a prouvé que l'action microbicide du sérum n'augmente que lorsque les leucocytes deviennent malades spécialement pendant la coagulation du sang : le sérum est

plus bactéricide que le plasma obtenu en gênant la circulation dans un membre et en récoltant le liquide d'œdème qui se forme.

Les deux phénomènes importants que nous venons de passer très rapidement en revue, la phagocytose d'une part et l'état bactéricide d'autre part, contribuent chacun dans des proportions variables à la résistance de l'organisme vis-à-vis des infections.

Nous savons que cette résistance peut être modifiée par des causes multiples.

L'élévation de la température du corps en est un exemple. (Löwy et Richter ont montré que des lapins maintenus à 41° sont résistants vis-à-vis de l'infection par le pneumocoque.) Cette question encore peu explorée est intéressante au point de vue clinique, parce qu'elle se rattache directement à l'action de la fièvre comme moyen de protection contre l'invasion microbienne. D'autres éléments peuvent augmenter encore momentanément la résistance : l'inoculation sous-cutanée d'extraits glandulaires, de thymus, de sérums normaux, même de solution physiologique (Issaeff). On est d'accord pour rapporter l'action de ces différentes substances à une excitation spéciale de la phagocytose se manifestant par une leucocytose abondante.

Metchnikoff a montré que cette leucocytose

est précédée d'un état spécial de phagolyse, c'est-à-dire d'une destruction momentanée des phagocytes, probablement en rapport avec la mise en liberté de substances bactéricides actives.

En résumé, la défense naturelle de l'organisme au moyen des substances bactéricides répandues dans le sang a été beaucoup exagérée; il est bien certain qu'il n'y a pas de rapport causal entre l'état microbicide des humeurs et la disposition à l'infection; ce sont avant tout les leucocytes qui servent de protection principale contre l'invasion microbienne.

Nous avons considéré jusqu'ici un organisme normal mis en présence d'un microbe pathogène et les réactions au moyen desquelles l'élément nocif peut être repoussé.

Mais la disposition à l'infection est un phénomène très individuel, qui dépend de facteurs multiples et qui varie d'après les espèces, les races et même les individus; généralement, cette résistance naturelle n'est pas très développée mais on connaît des exemples de résistance complète à certaines infections c'est-à-dire d'état réfractaire absolu. La cause de cette immunité naturelle est encore très obscure: pourquoi la souris des champs est-elle réfractaire à l'infection par le bacille de la septicémie des souris à laquelle la souris de maison est très sensible?

L'ancienne expérience de Pasteur qui rend la poule sensible au charbon en refroidissant ses pattes a rétréci le cadre de l'immunité naturelle et rappelle certains faits cliniques qu'on réunit sous le nom de microbisme latent. Au point de vue clinique on a pu démontrer la présence de bacilles diphtériques virulents dans la gorge de personnes bien portantes et on a retrouvé fréquemment le pneumocoque, également virulent, dans la salive normale.

En réalité, l'immunité naturelle, à quelque degré qu'on l'envisage, soit comme un manque de disposition à l'infection, soit comme un état réfractaire absolu, peut s'expliquer par une sensibilité spéciale des leucocytes, tandis qu'il est impossible d'invoquer ici la présence de substances bactéricides ou d'alexines. Nous savons d'ailleurs, que des animaux sensibles à certaines maladies possèdent un sérum très bactéricide et réciproquement que des animaux réfractaires ont un sérum inactif. Le chien, par exemple, est réfractaire au charbon. Son sérum n'est pas bactéricide *in vitro* pour le bacille charbonneux tandis que le lapin, animal très sensible, à ce virus, possède un sérum nettement microbicide.

L'immunité naturelle contre certaines toxines existe souvent parallèlement à l'état réfractaire contre les bactéries. Les souris et les rats

sont insensibles au poison diphtérique et les poules supportent des doses énormes de poison tétanique. Il est impossible d'admettre ici l'existence de contre-poisons ou d'antitoxines préformées. Behring a tenté d'expliquer ces faits encore obscurs par une insensibilité héréditaire des cellules pour ces toxines (immunité histogène).

III. — *L'Immunité spécifique.*

L'immunité spécifique dont nous allons passer en revue les principales manifestations est dirigée surtout contre le microbe ou la toxine qui ont servi à produire l'état réfractaire. Ce sont les belles expériences de Pasteur sur le choléra des poules qui ont été le point de départ de recherches expérimentales dans ce domaine important de la bactériologie.

L'immunité spécifique peut se conférer de six façons différentes :

1° Par une *atteinte* antérieure de la maladie qui produit dans l'organisme des modifications assez profondes pour le rendre réfractaire à une nouvelle infection (exemple : la variole).

2° Par l'inoculation d'un *virus atténué*, c'est à-dire d'éléments morbides dont la virulence a été diminuée artificiellement d'après le principe

de Pasteur (vaccination contre la variole, immunité antirabique, etc.)

3° Par l'injection de ***microbes*** vivants ou tués (vaccination contre le choléra, la fièvre typhoïde.)

4° Par l'injection de ***toxines*** microbiennes (immunisation pour l'obtention des serums thérapeutiques)

5° Par l'inoculation de ***substances chimiques*** extraites des cultures, comme la malléine ou la tuberculine (proteïnes).

Les cinq procédés que nous venons de citer ont eu pour but de conférer une immunité spécifique ***active***, sous l'influence de laquelle les humeurs et les cellules ont subi une transformation durable : cet état d'immunité active apparaît assez tardivement, mais persiste longtemps et les modifications cellulaires qui l'accompagnent impliquent généralement un état morbide préalable.

Ehrlich a opposé à cette immunité active, une sixième méthode d'immunisation qui consiste à injecter du ***sérum*** enlevé à un animal vacciné; c'est l'immunité passive ou sérothérapie. Le principe de l'immunité passive a été découvert en 1877 par Raynaud (le sérum de veau vacciné protège contre la vaccine). L'inoculation sous-cutanée d'un sérum spécifique est une opération

inoffensive par elle-même : l'immunité passive n'implique pas d'état morbide préalable; elle s'établit instantanément mais sa durée ne se prolonge pas au delà de six semaines.

Immunité bactéricide et antitoxique.

Les différentes méthodes d'immunisation spécifique aboutissent d'une part à activer la phagocytose et d'autre part à former dans le sang des substances spécifiques qui agissent directement sur les microbes (immunité bactéricide) ou sur leurs toxines (immunité antitoxique). Dans l'immunité bactéricide, on forme un sérum bactéricide qui aura la propriété de détruire les bactéries en dissolvant leur membrane d'enveloppe. Dans l'immunité antitoxique on obtient au contraire un sérum doué de propriétés neutralisantes vis-à-vis des toxines microbiennes.

Il importe d'entrer ici dans quelques détails concernant le mode d'action de ces deux sérums.

Mode d'action des sérums bactéricides :

Fränkel et Sobernheim ont mis en évidence en 1894, ce fait important que les sérums spécifiques supportent impunément l'action de la chaleur : un sérum, chauffé à 55° pendant une demi-heure, confère l'immunité à un animal neuf.

Bordet a montré vers la même époque que les sérums bactéricides contiennent deux substan-

ces : l'une qui résiste à la chaleur (substance préventive, substance spécifique, anticorps, sensibilisatrice) l'autre qui se détruit facilement (alexine de Buchner).

Bordet a complété ces expériences en 1895. Il a démontré que la substance préventive est incapable par elle-même d'agir sur les microbes Ce n'est que lorsqu'on la met en contact avec une alexine normale qu'elle acquerra des propriétés antiseptiques énergiques.

Bordet a été plus loin et a admis pour expliquer le rôle de la phagocytose, que la substance spécifique pénètre dans les leucocytes où elle rencontre la matière bactéricide normale : dès ce moment le leucocyte dispose d'un pouvoir antiseptique puissant et spécifique. — Alors, ou bien il englobera et anéantira les microbes (phagocytose) ou bien, s'il souffre, il laissera diffuser la matière bactéricide qu'il retenait et produira de la sorte, à distance, dans le liquide ambiant, la destruction ou l'affaiblissement du microbe.

C'était en somme une explication ingénieuse du phénomène intéressant que Pfeiffer a découvert à ce moment-là et qui consistait dans la destruction extra-cellulaire des bactéries.

Pfeiffer a vu pour la première fois, des bacilles du choléra se dissoudre dans l'exsudat péritonéal des animaux immunisés bactériolyse).

Phénomène de Pfeiffer.

On peut répéter très facilement cette expérience en injectant dans le péritoine d'un cobaye immunisé, une culture de vibrion cholérique ou bien en inoculant à un animal neuf une émulsion de vibrions dans du sérum spécifique. On prélève l'exsudat péritonéal de 10 en 10 minutes au moyen de tubes capillaires et on examine sous le miscroscope en goutte pendante.

On constate d'abord l'immobilisation des vibrions, puis la formation de granules arrondies et enfin la dissolution complète des bactéries qui disparaissent sans laisser de traces.

Quel est le mécanisme de cette destruction des corps microbiens?

Il n'était pas douteux pour Pfeiffer que les substances bactéricides ne peuvent pas tuer directement les bactéries; il émit l'opinion que l'action bactéricide du sérum se produit indirectement par une transformation de substance bactéricide inactive en corps microbicide actif au moyen d'une combinaison avec les cellules du péritoine.

Pfeiffer a invoqué l'analogie entre ce phénomène et le mode d'action de certains ferments qui n'agissent que sur un seul protoplasme en le décomposant, comme la pepsine ou la trypsine par exemple dissolvent l'albumine coagulée ou la fibrine. — Il y a même des ferments qui sont

spécifiques, qui ne peuvent décomposer que des sucres d'une certaine constitution chimique, et qui sont inactifs vis-à-vis des autres. — En résumé, d'après Pfeiffer, l'anticorps spécifique doit exister dans le sérum sous deux formes : une forme inactive très stable et une forme active peu stable. — Pour obtenir la dissolution des bactéries, la substance inactive se transforme en substance active sous l'influence d'une enzyme spéciale.

Hypothèse de Pfeiffer.

Metchnikoff répétant l'expérience de Pfeiffer parvint à la reproduire in vitro, sans le secours de l'organisme et Bordet observa la granulisation des vibrions sous l'influence du sérum anticholérique frais. Si le sérum n'est pas frais ou s'il est chauffé à 60°, le phénomène ne se produit plus; on le remet en évidence par l'addition de sérum normal.

Il résulte donc des travaux de Metchnikoff et Bordet que dans le sérum bactéricide spécifique soumis à une température de 60°, une substance essentielle a été détruite et qu'elle existe dans le sérum normal.

En résumé tout sérum bactéricide spécifique contient deux substances : 1° la substance bactéricide normale ou alexine (détruite à 60°); 2° la substance préventive ou spécifique (*immunkörper* des allemands), (sensibilisatrice des fran-

çais) beaucoup plus résistante que la première.

La substance préventive facilite l'action bactéricide des alexines normales en immobilisant et en agglutinant les bactéries : en un mot, elle rend les microbes aptes à subir l'action de ces alexines.

Metchnikoff considère le phénomène de Pfeiffer comme un stade préparatoire de la phagocytose : les sécrétions leucocytaires granulisent les vibrions et favorisent ainsi l'englobement. — Pfeiffer au contraire n'admet que la destruction extracellulaire amenée par les substances bactéricides produites dans l'organisme sous l'influence des inoculations spécifiques. Quoi qu'il en soit, le rôle du phénomène de Pfeiffer a été beaucoup exagéré par les partisans de la théorie humorale ; on lui avait attribué une portée énorme contre la phagocytose; mais un fait reste certain c'est que la dissolution extra-cellulaire se fait exceptionnellement, tandis que la phagocytose intervient régulièrement dans toutes les phases de l'immunité.

Les travaux de Bordet sur les sérmus hémolytiques (hémotoxines) qui ont la propriété de dissoudre *in vitro* les globules rouges, ont été le point de départ d'expériences nouvelles pour expliquer le mode d'action des sérums bactéricides.

Ehrlich a appliqué à l'immunité bactéricide sa théorie des chaînes latérales du protoplasme (Seitenketten Théorie) réservée jusqu'alors à l'explication de l'immunité antitoxique.

D'après lui, la substance spécifique (Zwischenkörper ou trait-d'union) sert d'intermédiaire entre l'alexine (Endkörper, Complement) d'une part et le corps microbien d'autre part.

Grâce à sa double affinité, la substance spécifique se combine à ces deux éléments et il résulte de cette combinaison une dissolution des bactéries.

Puisqu'il est prouvé que nous possédons actuellement un grand nombre de sérums bactéricides spécifiques, il semblait logique d'admettre que ces sérums pourraient servir à traiter les maladies infectieuses humaines, puisqu'il s'agit de détruire les microbes et qu'une méthode radicale de supprimer leur action nocive, serait de les dissoudre au moyen d'une substance active, spécifique et inoffensive pour l'organisme humain.

Les premiers essais de la sérothérapie bactéricide au traitement des maladies infectieuses n'ont pas été encourageants : on a injecté sans résultats de fortes doses de sérums anticholérique, antityphique, antistreptococcique, etc. A quelles causes attribuer ces insuccès ? Nous avons vu que les serums bactéricides n'ont pas

d'action antitoxique. On a cru pendant tout un temps que l'inefficacité des sérums était due à cette particularité.

Mais Pfeiffer et Wassermann ont démontré en 1893 que lorsqu'on dépasse une certaine dose de culture virulente dans les expériences d'essais des sérums bactéricides, on n'obtient jamais la guérison, quelle que soit la valeur spécifique et la quantité de sérum injecté. Il leur est arrivé de constater que les animaux succombent avec un excès de matière bactéricide dans le sang et qu'une petite partie de ce sang suffit pour protéger des animaux normaux contre l'infection mortelle. On peut supposer que dans ces expériences l'animal neuf dispose encore d'alexines combinables avec la substance spécifique, tandis que ces alexines ont disparu ou diminué chez l'animal succombant à l'infection.

Il ne suffit pas pour guérir l'organisme infecté c'est-à-dire pour dissoudre les bactéries qu'il contient, que la substance spécifique soit inoculée en grande quantité; on peut en injecter des masses énormes qui n'auront aucun effet, si la substance spécifique ne trouve pas dans l'organisme infecté l'alexine normale qui doit agir sur les corps microbiens et amener leur dissolution.

On peut donc supposer que le malade a utilisé

son alexine normale au cours de l'infection. Wassermann a démontré tout récemment qu'en inoculant en même temps que le sérum spécifique une certaine quantité d'alexine normale provenant d'une autre espèce, on guérit l'animal infecté. Malheureusement, le choix de l'alexine introduite n'est pas indifférent : le sérum de cobaye normal n'a aucun effet sur l'infection typhique intrapéritonéale du cobaye ; mais Wassermann a vu que l'alexine du bœuf a une action caractéristique : cette alexine inoculée au cobaye en même temps que la substance spécifique (sensibilisatrice) dissout les bactéries et guérit les animaux, alors que la sensibilisatrice seule reste inactive.

On peut certes prévoir une grande extension de la sérothérapie au traitement des maladies infectieuses lorsqu'on aura trouvé la sensibilisatrice spécifique et l'alexine qui se combinent le mieux dans le corps humain.

D'après Ehrlich, on peut se contenter, pour simplifier le problème, de chercher empiriquement l'espèce animale qui convient le mieux pour l'immunisation et pour la fourniture de la sensibilisatrice ou de l'alexine se combinant le mieux dans l'organisme humain. Avant d'en arriver là, on devra étudier complètement les alexines qu'on ne connaît pas du tout et démontrer les

variations quantatives de ces substances au cours des infections. Il est probable que les alexines des différentes espèces animales, tout en se ressemblant beaucoup, offrent des caractères particuliers et spécifiques; Bordet a montré récemment que leurs effets peuvent être neutralisés par des sérums « anti-alexiques » et que ces nouveaux sérums sont spécifiques.

Agglutination des bactéries :

Pour terminer l'étude du mode d'action des sérums bactéricides, il nous reste à passer en revue un des phénomènes les plus intéressants qu'on ait découvert dans ces dernières années et dont le rôle dans l'immunité est encore assez obscur : c'est l'***agglutination*** des bactéries par les sérums spécifiques.

Si on mélange à une émulsion de bacilles, de vibrions cholériques par exemple, un peu de sérum spécifique, on voit ces bacilles s'immobiliser et se réunir bientôt en amas. Le liquide primitivement troublé d'une façon bien homogène, se remplit de véritables grumeaux qui tombent au fond du tube.

Ce phénomène de l'agglutination a été vu primitivement par Charrin et Roger pour le bacille pyocyanique (1889[1].

Grüber a attiré l'attention sur l'importance de ce phénomène au point de vue de l'identifi-

cation de certaines bactéries pathogènes, telles que le bacille d'Eberth et le vibrion du choléra.

Enfin Widal a démontré le pouvoir agglutinant du sang de malades atteints de fièvre typhoïde, même pendant la période d'infection, tout au début de la maladie (séro-diagnotic).

L'agglutination est donc devenue le point de départ de deux découvertes importantes : le diagnostic différentiel de certaines bactéries pathogènes et la démonstration d'une fièvre typhoïde aux premiers jours de l'affection.

Le pouvoir agglutinant représente une propriété générale de tous les sérums bactéricides obtenus par l'immunisation au moyen des corps microbiens. — L'immunisation par les toxines ne donne aucune qualité agglutinante au sérum.

Les sérums normaux, bien frais, ont un certain pouvoir agglutinant vis-à-vis des microbes les plus divers, mais cette propriété est beaucoup moins développée que dans les sérums spécifiques. Elle est cependant suffisante pour nécessiter l'emploi de méthodes quantitatives exactes lorsqu'il s'agit d'utiliser l'agglutination dans un but de diagnostic différentiel.

On a émis un grand nombre d'hypothèses pour expliquer l'agglutination :

Retenons les quatre théories qui paraissent le plus en harmonie avec les faits :

Les théories de l'agglutination.

A. *Hypothèse de Paltauf* : Les microbes sont entraînés mécaniquement par un précipité extrabactérien (précipité de Kraus) se produisant dans de vieilles cultures filtrées additionnées d'une grande quantité de sérum.

B. *Hypothèse de Nicolle* : L'auteur admet la théorie de Paltauf, mais la complète par l'hypothèse de la viscosité ou de la coalescence de la membrane bactérienne (Grüber). Il se formerait un précipité entraînant les bactéries, qui sont devenues « gluantes » et restent accolées.

C. *Hypothèse de Duclaux* : Il y aurait une véritable coagulation se traduisant par un dépôt à la surface des microbes d'une substance en dissolution dans le liquide ambiant.

Les conditions d'équilibre des microbes vis-à-vis du liquide ont changé, d'où agglomération des éléments.

D. *Hypothèse de Bordet* : L'agglutination dépend de lois physiques : l'addition de sérum spécifique change l'adhésion moléculaire entre les microbes et le liquide ambiant. L'agglutinine est fixée par les bactéries. La présence de sels, en modifiant la tension superficielle du microbe, amène l'agglutination; au lieu d'être extra cellulaire comme dans l'hypothèse de Duclaux, la coagulation serait intracellulaire.

Expériences nouvelles.

Aucune de ces hypothèses ne parvient à résoudre complètement le problème.

D'après des expériences récentes, Joos a pu démontrer que l'agglutination se réduit à une combinaison chimique parfaitement définie.

Cette combinaison se produit entre le protoplasme microbien et les substances spécifiques du sérum : il y a dans le protoplasme au moins deux substances combinables : l'une se détruit à 60°, l'autre résiste à cette température. La première se trouve en plus grande quantité que la seconde.

A chacune de ces substances correspondent dans le sérum spécifique des anticorps spéciaux avec lesquels elles s'unissent en combinaisons plus ou moins stables.

Ces faits sont démontrés par l'expérience et on peut prouver l'existence de chacune de ces substances

Les rapports entre l'agglutination et l'immunité sont encore peu connus. Grüber voyait dans l'agglutination la cause principale de l'immunité, mais les expériences de Pfeiffer ont montré que le sérum le plus spécifique et le plus bactériolytique peut ne pas être agglutinant.

En résumé, il semble logique d'admettre que les microbes agglutinés ont subi une altération de leur membrane et qu'ils seront dès lors plus aptes à subir l'action bactériolytique.

On ne connait pas l'origine des agglutinines; il paraît cependant que le pouvoir agglutinant de la rate est supérieur au pouvoir agglutinant du sérum au moins au début des infections.

2° *Mode d'action des sérums antitoxiques* :

Nous avons considéré jusqu'ici les phénomènes de l'immunité contre les bactéries. Il nous reste à passer en revue les sérums qui sont dirigés contre les poisons microbiens et qui renferment des antitoxines spécifiques. Nous savons déjà par la clinique que le sang des convalescents de diphtérie et de tétanos, renferme des antitoxines. Le résultat de l'immunisation contre les toxines est d'amener dans l'organisme et spécialement dans le sang, des corps nouveaux dont la constitution chimique nous est totalement inconnue et qui possèdent des propriétés préventives et curatives contre l'intoxication spécifique.

Lorsqu'on injecte à un animal des doses croissantes d'un poison animal ou végétal, il se forme généralement dans cet organisme un contrepoison, une antitoxine Au point de vue bactériologique, nous ne connaissons que l'antitoxine tétanique et l'antitoxine diphtérique. Comme propriétés générales, on reconnaît aux antitoxines le pouvoir de préserver contre l'intoxication et de guérir l'organisme lorsque l'intoxication s'est déjà établie.

Toxines et antitoxines.

Behring et Kitasato avaient considéré dans leur premier travail les toxines comme détruites par l'antitoxine. Il s'agissait d'après eux d'une neutralisation des toxines dans le sens chimique absolu. Le rôle de l'organisme dans la guérison d'une intoxication était tout à fait passif.

Les expériences précises de Buchner ont démontré au contraire que les cellules vivantes intervenaient dans le phénomène, et il a expliqué l'action des sérums antitoxiques par une immunisation rapide des territoires cellulaires non encore atteints par le poison.

Nous savons depuis les expériences de Roux qu'un mélange de toxine et d'antitoxine neutre pour certains animaux peut être mortel pour d'autres espèces plus sensibles : ainsi un mélange de toxine tétanique et de sérum antitoxique peut être inoffensif pour la souris et cependant donner le tétanos à un cobaye. Il est évident que si le poison avait été réellement détruit par son contact avec le contre poison, le mélange devait rester indéfiniment inactif, même pour les espèces animales plus réceptives.

Ces notions élémentaires sur le mode d'action des antitoxines ont subi de grandes modifications grâce aux travaux d'Ehrlich : il a démontré qu'il y a bien réellement combinaison entre la toxine et l'antitoxine et que cette combinaison se fait

Théorie d'Ehrlich.

suivant les lois des équivalents. On peut dire que cette théorie se place entre les opinions extrêmes soutenant d'une part la neutralisation chimique et d'autre part l'action indirecte des antitoxines. Ehrlich invoque pour expliquer l'action des antitoxines, la présence d'une double combinaison. Partant de ses expériences sur la ricine qui agglutine les globules rouges in vitro, il a démontré que l'antiricine empêche cette action (sérum antiricinique) dans les mêmes proportions *hors* de l'organisme et *dans* l'organisme. Des expériences analogues de Kossel, de Kanthack et de Morgenroth ont démontré que l'action des antitoxines sur les toxines se fait in vitro dans les mêmes rapports que dans l'organisme. Ils ont pu exclure entièrement l'intervention de l'organisme vivant et dès lors l'action directe des antitoxines sur les toxines ne peut plus être mise en doute.

Ehrlich a donc montré dans des expériences très précises que cette neutralisation se fait suivant les lois des équivalents, c'est-à-dire que si une unité de poison est neutralisée par une certaine quantité d'antitoxine, dix fois plus d'antitoxine neutralisera dix unités de poison. Si l'action ne paraît pas toujours aussi schématique, cela tient à ce que les poisons microbiens qui servent à ces expériences sont des corps très complexes,

de composition variable et également très instables.

Origine des antitoxines.

Le problème de l'origine des antitoxines, hautement intéressant au point de vue de la thérapeutique des maladies infectieuses, n'est pas encore résolu actuellement. On a cru à l'existence d'antitoxines dans le système nerveux normal, parce que la toxine tétanique est fixée par la substance cérébrale (Wassermann). Mais Metchnikoff a montré que cette fixation n'est pas définitive : la toxine peut encore diffuser dans les liquides de macération de substance nerveuse même après sa fixation : cette action n'est donc pas assimilable à l'action de l'antitoxine sur la toxine.

D'après Ehrlich, l'antitoxine est un corps produit dans certaines cellules de l'organisme et y existant à l'état normal. Les cellules sensibles à une toxine sont entraînées par des apports progressivement croissants de toxine, à former les antitoxines.

Pour qu'il y ait intoxication, d'après Ehrlich, il faut que certaines cellules de l'organisme vivant se combinent à une toxine. La partie de ces cellules qui entre en combinaison constitue « la chaîne latérale toxophore du protoplasme ». Or, sous l'influence des intoxications répétées au cours de l'immunisation, certaines cellules

sont donc entraînées à produire cette substance combinable aux toxines. Les antitoxines ne sont dès lors que des fragments des cellules normales de l'organisme entrant en solution par cette excitation continue qu'entretient l'immunisation, c'est-à-dire l'injection répétée de toxines microbiennes. Ehrlich pense qu'il se produit un déficit dans l'équilibre de la cellule à chacune de ces combinaisons entre la toxine et la partie toxophore du protoplasme et que tout déficit doit être suivi de régénération. C'est donc en résumé l'excès de substance régénérée qui entre en solution, se déverse dans le sang et lui donne ses qualités spécifiques.

A cette théorie chimique très intéressante mais difficile à mettre en évidence par l'expérimentation, Metchnikoff oppose la théorie cellulaire qui est généralement admise aujourd'hui pour expliquer l'immunité bactéricide. Le rôle des phagocytes vis-à-vis des toxines est certainement beaucoup plus obscur que vis-à-vis des microbes : on comprend du reste combien l'observation des phénomènes est plus compliquée, puisque nous ne connaissons pas les toxines au point de vue chimique et que le réactif animal est le seul moyen que nous possédions pour mettre en évidence leurs propriétés spécifiques. Il faut reconnaître que Metchnikoff a déjà attiré l'atten-

tion en 1892 sur le rôle des phagocytes dans l'intoxication. Depuis lors, un grand nombre de travaux ont démontré l'action nocive (phtérotoxique) des globules blancs pour les toxines qui subiraient à l'intérieur des phagocytes une modification chimique (action des oxydases). Ces problèmes compliqués ne sont pas encore à la veille d'être résolus définitivement en faveur de l'une ou de l'autre théorie.

CHAPITRE XI

Les Résultats pratiques de l'immunité.

Il nous a paru utile de faire suivre ce résumé des phénomènes de l'immunité d'un exposé rapide des résultats pratiques auxquels ont conduit jusqu'ici ces études expérimentales, en nous cantonnant exclusivement dans la pathologie humaine, car l'art vétérinaire a bénéficié aussi largement des découvertes récentes dans ce domaine de la bactériologie.

Il importe de considérer à part l'immunité active et l'immunité passive.

L'immunité active, employée surtout comme méthode préventive, a donné jusqu'ici la vaccination jennerienne, la vaccination anticholérique, la vaccination antityphique et la vaccina-

tion préventive contre la peste. Comme méthode curative, elle a pu être appliquée au traitement de la rage humaine Mais la sérothérapie, c'est-à-dire l'immunité passive, constitue la véritable méthode thérapeutique de l'avenir. Nous connaissons jusqu'ici les sérums antidiphtérique, antitétanique et antivenimeux.

1° *Vaccination contre la variole :*

La variole a exercé ses ravages depuis la plus haute antiquité. Lady Montague introduisit la variolisation en Angleterre en 1721.

C'est en 1798 que Jenner découvrit le principe de la vaccination et observa que l'inoculation du virus vaccinal provenant de la vache ou du cheval provoque chez l'homme une maladie bénigne dont l'évolution a pour effet de rendre l'organisme réfractaire aux atteintes de la variole.

Toutes les tentatives faites jusqu'ici pour découvrir l'agent étiologique de cette affection sont restées sans résultats : il est probable que le virus variolique n'est pas une bactérie, mais un protozoaire, de la famille des sporozoaires. (Pfeiffer.)

Il n'est pas douteux que la variole et la vaccine sont deux affections identiques.

La variole inoculée au veau se transforme en vaccine au bout de quelques passages.

L'inoculation variolique a pour effet de préserver ces animaux contre une atteinte ultérieure de vaccine.

On n'a pas encore réussi à transformer la vaccine en variole ; on n'a obtenu dans les circonstances les plus favorables qu'une variole mitigée, une espèce de varioloïde. (Millard, Galli-Valerio, Marchoux.)

En Belgique, l'organisation administrative de la vaccination laisse beaucoup à désirer : si la vaccination était obligatoire, la variole aurait disparu depuis longtemps de notre pays. On constate encore des épidémies assez graves : à Ostende, en 1889, sur 25,000 habitants, on a compté 440 décès, soit 18 p. c. En Allemagne, où la vaccination est obligatoire, on constate pour une période de quatre ans (1889-1893), pour 1 million d'habitants, 2.3 décès. Pendant la même période on a eu pour la France : 148 décès par million d'habitants; pour la Belgique : 253 décès par million d'habitants; pour l'Autriche : 313 décès par million d'habitants; pour la Russie : 836 décès par million d'habitants.

Ces chiffres se passent de commentaires.

2° *Vaccination préventive contre le choléra* : Les premiers essais datent de 1885 : Ferran a pratiqué les inoculations en Espagne sur 25,000 personnes. Ces expériences ont été re-

prises en 1894, par Haffkine, qui a inoculé aux Indes 42,000 personnes.

On pratiquait deux injections à cinq jours d'intervalle. Le premier vaccin était une culture de choléra à l'étuve à 39° afin de diminuer la virulence du bacille.

Le deuxième vaccin était une culture virulente.

Les résultats obtenus sont très typiques :

Dans un quartier de Calcutta, par exemple, sur 321 habitants, 181 personnes inoculées ont eu quatre fois le choléra. Parmi les autres, on constate 45 cas de maladie et 30 morts.

En résumé, grâce aux inoculations, la mortalité générale dans les épidémies tombe de 10 p c. à 1 p. c.

Nous devons attacher une grande importance, au point de vue européen, à cette tentative qui consiste à attaquer le choléra dans son propre foyer hindou et à essayer de le déraciner de ces pays orientaux qui sont le point de départ de toutes les grandes épidémies en Europe.

On a pratiqué de même des injections préventives contre la fièvre typhoïde, par inoculation sous-cutanée de cultures chauffées.

Haffkine a fait la même chose pour la peste : l'immunité conférée par ces inoculations est de beaucoup plus longue durée que l'immunité

passive fournie par les injections de sérum. Pour la peste, on a préféré inoculer en même temps le sérum et les cultures afin d'éviter les réactions trop fortes qui auraient pu se produire chez des personnes qui sont déjà sous l'influence de la maladie au moment des inoculations.

3° *Vaccination antirabique :*

Les immunisations actives que nous avons considéré jusqu'ici ont un but *préventif*. Nous connaissons depuis 1881, grâce aux travaux de Pasteur, un procédé d'immunisation active, appliqué pour guérir une maladie. C'est le traitement antirabique.

Vaccination antirabique.

La rage est une maladie qui atteint surtout le chien (92 p. c.), quelquefois le chat 6 p. c.) ou même les herbivores. Elle se transmet expérimentalement par inoculation, sous la dure-mère, d'une parcelle du bulbe d'un animal atteint de rage.

La rage inoculée à l'homme par morsure a une période d'incubation minima de vingt à trente jours. On parvient à immuniser rapidement le malade entre le moment de l'inoculation du virus et l'apparition des premiers symptômes.

Pasteur a démontré que le virus rabique transporté par inoculation de lapins en lapins, arrivait à un maximum de virulence en produisant des symptômes mortels après une période constante d'incubation ne dépassant pas six jours : c'est le virus fixe.

En 1884, Pasteur a découvert ce fait important que l'inoculation sous-cutanée au chien de moelles de plus en plus virulentes procure l'immunité contre l'inoculation ultérieure de produits très actifs et mortels pour les animaux témoins. Pour rendre cette découverte pratique et l'appliquer au traitement de la rage humaine, Pasteur a réussi à diminuer la virulence des moelles rabiques par la dessiccation : cette dessiccation prolongée jusqu'au quinzième jour, donne des moelles de moins en moins virulentes, avec lesquelles on débute dans le traitement.

On arrive ainsi petit à petit, après deux ou trois semaines d'inoculations répétées souvent plusieurs fois par jour, à faire supporter au malade l'injection du virus fixe le plus actif. Quand on atteint ce moment, le malade peut-être considéré comme guéri

Les inoculations antirabiques ont fait tomber la mortalité de la rage humaine de 16 p. c. à 1 p. c. environ.

Högyes a employé depuis cinq ans une méthode d'inoculation contre la rage asssz différente de celle de Pasteur et il prétend avoir obtenu de très bons résultats par le procédé suivant :

On dilue le virus fixe au lieu de dessécher les moelles. Le traitement dure quatorze jours. On

injecte d'abord des moelles diluées dans 1 : 10,000 de solution physiologique. On arrive bientôt à 1 : 200. Le dosage du virus est plus commode que par la méthode de dessiccation.

Immunité passive. Sérothérapie.

1° *La sérothérapie antidiphtérique* :

Ce qui a fait le succès de la sérothérapie antidiphtérique, c'est qu'elle était basée sur des résultats expérimentaux absolument rigoureux et concluants. Nous manquons malheureusement de renseignements précis sur la nature et sur l'action des antitoxines qui n'ont été obtenues que dans la diphtérie et dans le tétanos.

Malgré le grand nombre d'inoculations de sérum qui ont été pratiquées dans tous les pays depuis cinq ans, nos méthodes de préparation du sérum n'ont pas fait beaucoup de progrès et sont restées ce qu'elles étaient à l'époque de la découverte de Behring.

La préparation d'une toxine active est le facteur principal dans la préparation du sérum antidiphtérique : les conditions à remplir pour obtenir des bouillons toxiques ont été examinées au chapitre de la diphtérie.

L'immunisation des chevaux se pratique en inoculant des doses croissantes de ces bouillons

toxiques. Les inoculations doivent être continuées pendant toute la durée de l'immunisation, à intervalles réguliers. Ces injections se feront aseptiquement. Les seringues doivent être bien stérilisées dans l'eau bouillante avant l'emploi. Les pistons d'asbeste sont très recommandables. Pour les injections volumineuses, de plus de 100 gr., nous nous servons d'une seringue armée d'un tube en caoutchouc épais : l'aiguille, de 10-12 centimètres de longueur, est réunie à ce caoutchouc par un pas de vis, qui évite les accrocs pendant l'injection.

Après un certains temps, des adhérences assez fortes se produisent dans le tissu cellulaire sous-cutané et nécessitent une certaine force pour pratiquer l'injection et faire pénétrer le liquide sous la peau.

Les meilleurs chevaux pour l'immunisation sont les cobs demi-sang et les pur-sang. On débute généralement par 1/2 ou 1 gr. de toxine : nous n'avons jamais constaté d'accident à cette dose. Si l'injection est bien supportée, on peut monter rapidement à 5 et 10 gr. en pratiquant les injections tous les quatre ou cinq jours, lorsque les symptômes locaux et généraux de l'injection précédente ont disparu.

Il est nécessaire de prendre soigneusement la température rectale une ou deux fois par jour.

En se guidant sur ces indications, on arrive petit à petit aux fortes doses de 50, 100, 200 gr. Nous ne dépassons pas 300 gr. par injection et il est même préférable dans ce cas de pratiquer trois injections de 100 gr. à trois endroits différents : on évite de cette façon les abcès qui retardent l'immunisation.

Les essais provisoires de la valeur antitoxique du sérum sont pratiqués en introduisant une aiguille à injection dans le veine vugulaire : le sang s'écoule goutte à goutte et en récoltant dans une éprouvette de 10 c. c. on obtient suffisamment de sérum pour un essai.

Les grandes saignées sont pratiquées en introduisant dans la veine un trocart taillé en forme de plume à écrire. Un tube de caoutchouc relie ce trocart à des vases de 1 litre dans lesquels se récolte le sang. On doit avoir soin de stériliser ces éprouvettes à l'autoclave et non pas à l'étuve sèche, car sinon le caillot adhère aux parois et la coagulation se fait très mal.

On laisse déposer pendant vingt-quatre heures; on peut recueillir, avec des flacons cylindriques, 400 grammes de sérum par litre de sang. La saignée doit se faire de préférence huit jours après le dernière injection.

Essai du sérum :

1° *Méthode de Roux.*

On injecte du sérum à un cobaye. Vingt-quatre heures après, 1/2 cc. de culture fraîche de diphtérie.

Si le cobaye résiste, et si l'injection de sérum correspond au cent-millième de son poids, on dit que le sérum est au cent-millième.

Cette méthode ne donne pas de résultats exacts et est généralement abandonnée.

2° *Méthode de Behring-Ehrlich* :

On inocule à une série de cobayes un mélange de sérum et de toxine. On prend des doses graduellement croissantes de sérum, en partant de ce principe que le sérum normal renfermant une unité antitoxique par cc. est un sérum qui neutralise dix doses mortelles de toxine à la dose de 0.10. La dose de toxine se calcule en prenant exactement la dose mortelle *minima* pour un cobaye de 250 grammes et en multipliant cette dose par 10.

On injecte ce mélange de toxine et de sérum sous la peau du dos à une série de cobayes. On fait des dilutions jusqu'à obtenir environ 4 ou 5 cc. de liquide.

Le sérum est généralement dilué au millième dans de l'eau physiologique : un gramme représente donc un milligramme de sérum. Le poison est dilué au dixième ; 1 gr représente donc 0 1

Exemple :

Un cobaye reçoit 0.001 de sérum et 0.2 de poison (10 doses mortelles).

Soit 1 gr. de la dilution de sérum (1 $^{0}/_{00}$).
2 gr. » » de poison (10 $^{0}/_{0}$).
2 gr. de solution physiologique.

Après quarante-huit heures, on n'observe pas de symptômes locaux. Ce sérum est considéré comme du sérum à 100, c'est-à-dire contenant 100 unités antitoxiques par centimètre cube.

Un autre cobaye avait reçu 0.00085 de sérum et est mort après huit jours, ayant présenté un fort œdème local.

Si les dosages sont très rigoureusement faits, cette méthode peut rendre de grands services. On préfère généralement une nouvelle méthode que nous allons résumer brièvement.

3° *Méthode d'Ehrlich :*

On considère, comme unité de toxine, la plus petite dose sûrement mortelle pour un cobaye de 250 gr., en quatre, cinq ou au maximum six jours.

L'unité antitoxique est la quantité de sérum qui, par mélange in vitro, parvient à neutraliser 100 unités de toxine,

Pour plus d'exactitude, ces deux valeurs, unité de toxine et unité antitoxique, sont estimées par *voie indirecte*. Pour l'unité de toxine on prend un sérum étalon et on commence par

ajouter à l'unité de ce sérum une dose suffisante de toxine pour neutraliser cette unité et en outre tuer l'animal (toxine en excès).

Cette dose toxique servira pour les essais.

Il suffira d'y ajouter des doses croissantes de sérum jusqu'à neutralisation complète pour constater la valeur du sérum.

Cent unités de toxine sont neutralisées par 0.01 de sérum; or, comme 100 unités de toxines sont neutralisées par 1 gr. de sérum normal, le sérum X est cent fois plus actif et renferme 100 unités par cc.

La dose d'essai de la toxine est évaluée au moyen d'un « test-serum » délivré par l'Institut officiel du gouvernement allemand. Ce test-serum est conservé desséché dans le vide et garde longtemps sa valeur. Une unité de ce sérum étalon est mélangée à des doses croissantes de toxine et on recherche d'une façon précise la dose minima de toxine qui fait succomber un cobaye en quatre jours. Cette dose de toxine (nécessaire pour neutraliser une unité d'immunisation et de plus produire la mort des cobayes) est la dose d'essai pour le sérum.

On mélange cette dose d'essai du poison à 4 gr. de la solution du sérum à essayer. On inocule le mélange sous la peau d'un cobaye de 250-280 gr. Si l'animal succombe dans les

quatre premiers jours, le sérum n'a pas la valeur qu'on lui attribuait.

On se sert de préférence de poisons conservés depuis longtemps sous le toluol; il faut noter que la dose d'essai ne doit pas dépasser 1 c. c.

Exemple :

1° *Dilution du sérum étalon.*

Chaque flacon fourni par l'Institut contient du sérum glycériné à 17 unités par centimètre cube.

Il faut donc prendre 1 gr. de ce sérum et le mêler à 16 gr. d'eau pour obtenir un sérum contenant 1 unité par centimètre cube (solution type).

2° *Détermination de la dose d'essai de la toxine* :

1 gr. solution type de sérum + 0.40 toxine injectés à cobaye n° 1.

1 gr. solution type de sérum + 0.35 toxine injectés à cobaye n° 2.

1 gr. solution type de sérum + 0.30 toxine injectés à cobaye n° 3.

Après quatre jours :

Le cobaye n° 1 succombe; le n° 2 également; le n° 3 n'a rien.

La dose d'essai de la toxine sera de 0.35.

3° *Essai du sérum* :

On fait une solution au centième du sérum à essayer :

Le cobaye nº 4, 250 gr., reçoit 0.35 toxine + 1 gr. sérum 1 p. c (sérum à 100).

Le cobaye nº 5, 280 gr., reçoit 0,35 toxine + 0.66 gr. sérum 1 p. c. (sérum à 150).

Le cobaye nº 6, 270 gr., reçoit 0,35 toxine + 0.50 gr. sérum 1 p. c. (sérum à 200).

Le cobaye 6 meurt le quatrième jour.

Les cobayes 4 et 5 n'ont rien.

Le sérum contient *150 unités* par c. c.; en effet, il est cent cinquante fois plus antitoxique que le sérum normal (solution type).

Ces chiffres sont absolument schématiques et, en réalité, on doit fréquemment employer des séries de dix à douze cobayes pour obtenir une réponse bien nette.

Résultats de la sérothérapie antidiphtérique :

Dans tous les pays, la mortalité par diphtérie a diminué dans d'énormes proportions depuis l'introduction du sérum.

Prenons quelques chiffres au hasard :

A Paris, on a constaté en 1892, 1,398 décès par croup et diphtérie; depuis l'application du sérum, en 1897, on ne compte plus que 274 décès.

A Berlin, en 1893, il y avait 1,637 décès par diphtérie. En 1897, ce chiffre descend à 546.

Enfin à Bruxelles, on constatait avant la période sérothérapique, une moyenne de 84 décès par an (sans les faubourgs). En 1897, on n'enregistre plus que 16 décès.

Sérothérapie antitétanique :

La sérothérapie du tétanos n'a pas produit les résultats qu'on en attendait pour le traitement de cette maladie trop souvent mortelle. Cela tient à la rapidité avec laquelle les symptômes évoluent. On pense généralement que lorsque les symptômes tétaniques apparaissent, le poison spécifique s'est déjà combiné aux cellules nerveuses, surtout aux cellules de la moelle. L'injection d'une antitoxine tétanique ne peut plus avoir comme effet que la neutralisation du poison circulant dans l'économie; celui qui est déjà combiné aux cellules nerveuses ne peut plus en être séparé que difficilement, ainsi que l'ont démontré bien nettement les expériences récentes.

Sérothérapie antivenimeuse :

On constate chaque année plus de 20,000 décès aux Indes seulement, à la suite des morsures de serpents. En se servant de venins d'origines différentes, on peut obtenir un sérum très actif.

Il faut que ce sérum ait un pouvoir préventif d'au moins 10,000, c'est-à-dire qu'injecté au lapin à un dix-millième de son poids, il doit permettre l'inoculation, deux heures après, de

1 milligr. de venin de Cobra capello. Une dose thérapeutique moyenne de 10 c. c. renferme au moins 20,000 unités antivenimeuses.

Sérothérapie antipesteuse :

Il n'est pas sans intérêt de faire remarquer, pour finir, qu'un essai de sérothérapie a été tenté récemment avec un sérum bactéricide non antitoxique : c'est le sérum antipesteux, obtenu par l'inoculation de cultures vivantes de peste à des chevaux. Les inoculations pratiquées à Porto à doses massives (injections intraveineuses de 200 gr. et plus) ont produit des résultats encourageants : la mortalité, qui est généralement de 50 à 60 p. c., est tombée, grâce à l'emploi du sérum, au dessous de 10 p. c.

CHAPITRE XII

La Bactériologie des appareils.

Résumé.

Nous croyons utile de résumer ici sous forme de tableaux les affections microbiennes qui se rencontrent le plus souvent et la liste des produits morbides dont on aura le plus fréquemment l'occasion de faire l'examen bactériologique :

I. Appareil respiratoire :

A. *Affection croupales* : 1. Bacille de Löffler; 2. Streptocoque.

B. *Bronchites* : 1. Streptocoque; 2. Influenza.

C. *Broncho-pneumonies* : 1. Streptocoque; 2. Pneumocoque; 3. Pneumobacille.

Comme infection secondaire :

4. Bacille d'Eberth; 5. Bacille de l'influenza; 6. Colibacille.

D. *Pneumonies* : 1. Pneumocoque de Fränkel; 2. Pneumobacille de Friedlander; 3. Streptocoque; Staphylocoque.

E. *Pleurésies* : 1. Bacille de Koch; 2. Streptocoque; 3. Pneumocoque; 4. Influenza; 5. Bacille typhique; 6. Colibacille.

I. Appareil digestif :

A. *Affections du pharynx* : Bacille de Löffler; 2. Staphylocoques; 3. Streptocoques; 4. Pseudo-diphtérie.

B. *Parotidites* : 1. Staphylocoques; 2. Streptocoque.

C. *Affaires intestinales* : 1. Colibacille; 2. Streptocoque; 3. Bacille typhique; 4. Bacille du choléra; 5. Bacille de la diarrhée verte.

D. *Péritonites* : 1. Streptocoque; 2. Tuberculose; 3. Colibacille.

III. Appareil génito-urinaire :

A. *Urétrites* : 1. Gonocoque; 2. Diplocoques voisins (non spécifiques).

B. *Cysistes* : 1. Colibacille; 2. Streptocoque; Gonocoque; 4. Bacille de Koch.

C. *Vaginites* : 1. Gonocoque; 2. Streptocoque.

D. *Endométrites* : 1. Staphylocoque; 2. Streptocoque; 3. Gonocoque.

IV. Système nerveux :	*Méningites :* 1. Staphylocoque; 2. Meningocoque; 3. Tuberculose; 4. Pneumocoque.
V. Organes des sens :	A. *Conjonctivites :* 1. Bacille de Löffler; 2. Pseudo-diphtérie (b. de la xerose); 3. Streptocoques; 4. B. de Weeks (c. aigüe); 5. Diplobacille de Morax (c. chronique); 6. Gonocoque; 7. Meningocoque (?) B. *Otites :* 1. Staphylocoque; 2. Streptocoque; 3. B. de l'influenza; 4. B. de la tuberculose.
Produits morbides le plus fréquemment soumis à l'analyse :	1. PUS : Pouvant présenter les bactéries suivantes : *a.* Staphylocoques; *b.* Streptocoques; *c.* Gonocoque; *d.* B. du chancre mou; *e.* Meningocoque; *f.* Tétanos; *g.* Tuberculose; *h.* Actinomycose. 2. CRACHATS : *a.* Tuberculose; *b.* Streptocoque; *c.* Pneumocoque; *d.* Influenza; *e.* B. Friedlander. 3. FAUSSES MEMBRANES : Diphtérie, pseudo-diphtérie, staphylocoque, streptocoque. 4. EAUX : Typhus, b. coli, b. choléra. 5. SELLES : B. typhique, coli, choléra, streptocoque, b. de la diarrhée verte. 6. SANG : Sérodiagnostic, fièvre intermittente. 7. URINES : Colibacille, tuberculose, gonocoque, streptocoque et staphylocoque.

TABLE DES MATIÈRES

CHAPITRE IV

L'examen bactériologique des fausses membranes.

CHAPITRE V

L'examen bactériologique des crachats.

CHAPITRE VI

L'examen bactériologique des déjections.

CHAPITRE VII

L'examen bactériologique des eaux.

CHAPITRE VIII

L'examen bactériologique de l'air.

CHAPITRE IX

L'examen bactériologique du sang.

CHAPITRE X

L'immunité.

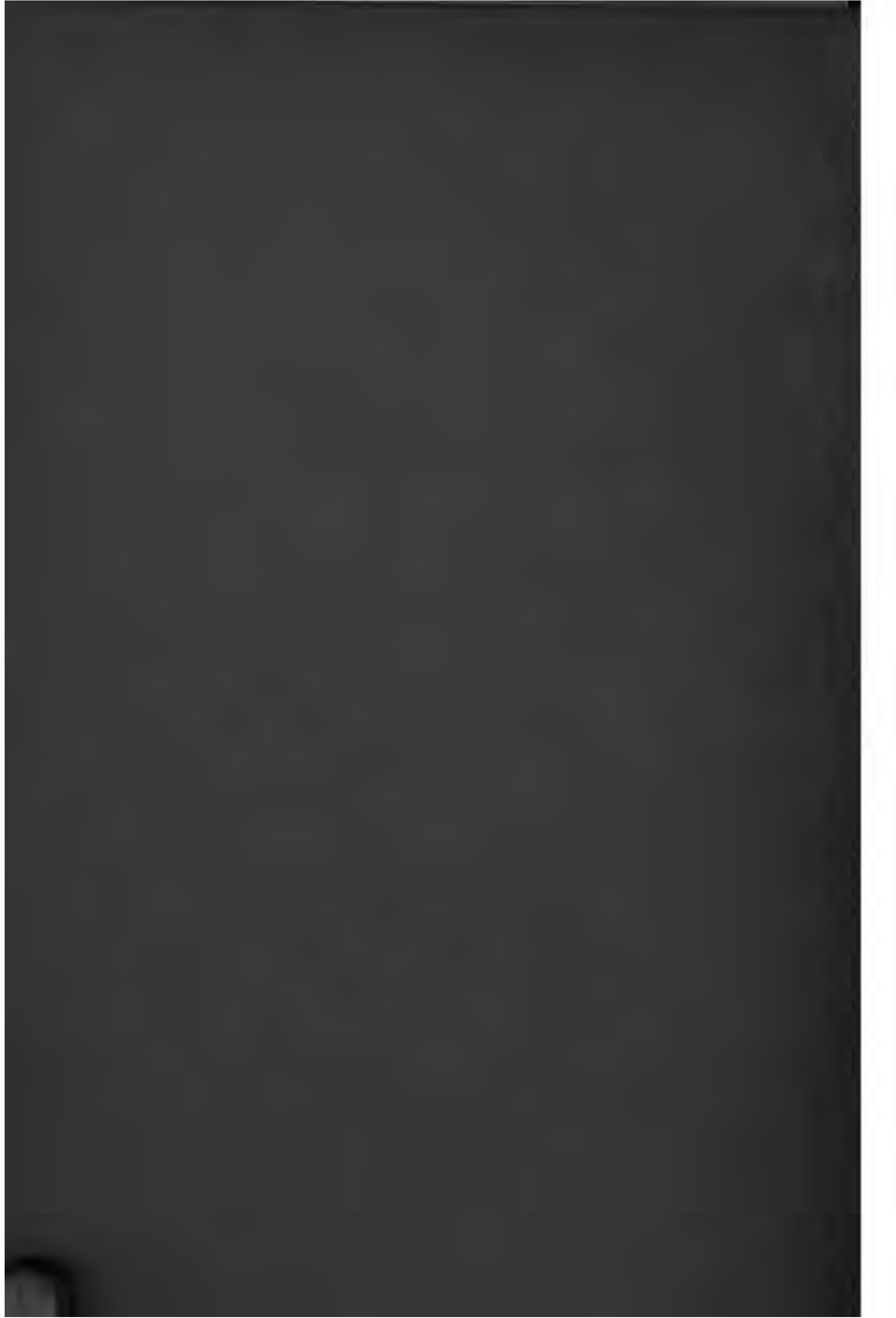
CHAPITRE XI

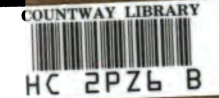
Les résultats pratiques de l'immunité.

CHAPITRE XII

TABLE ALPHABÉTIQUE

DES MATIÈRES




COUNTWAY LIBRARY
HC 2PZ6 B